

Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer.nat.)**

genehmigte

Dissertation

von

Kirsten Welter

aus Magdeburg

1. Referent:

Herr Professor Dr. K.-D. Vorlop

2. Referent:

Herr Privatdozent Dr. S. Lang

eingereicht am:

20.03.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am:

06.07.2000

2000

(Druckjahr)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Nachwachsende Rohstoffe	9
2.1	Stärke	11
2.2	Zucker	12
3	Zellimmobilisierung	14
3.1	Adsorptionsimmobilisierung	15
3.2	Einschlussimmobilisierung	16
4	Material und Methoden	20
4.1	Analytik	20
4.1.1	Glucose- und Itaconsäurebestimmung durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	20
4.1.2	Ammoniumbestimmung durch Fließinjektionsanalyse (FIA)	22
4.1.3	Nitratbestimmung durch Ionenchromatographie	23
4.1.4	Phosphatbestimmung durch photometrische Messung	24
4.1.5	Biomassebestimmung durch gravimetrische Methoden	26
4.1.5.1	Biotrockenmasse (BTM)	26
4.1.5.2	Biomassebestimmung in den Immobilisaten	26
4.1.6	Spurenelementebestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie	26
4.2	Abtrennung der Biomasse	27
4.2.1	Zentrifugation	27
4.2.2	Absatzweise Filtration	27
4.3	Immobilisierung	28
4.3.1	Adsorption auf Silikonträgern und auf Siranglas-Kugeln	28
4.3.2	Einschluss in cryogelierte Polyvinylalkohol-Perlen und linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®)	28
4.3.2.1	Immobilisierung in cryogelierte Polyvinylalkohol-Perlen	28
4.3.2.2	Immobilisierung in linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®)	30
4.4	Mikroskopische Untersuchung der Immobilisate	32
4.5.	Fermentationssysteme zur Itaconsäureproduktion	32
4.5.1	Schüttelkolben	32
4.5.2	1,8-L-Rührkesselreaktor zur Fermentation freier Zellen	32
4.5.3	0,5-L- Rührkesselreaktor zur Fermentation immobilisierter Zellen	35

4.6	Kultur- und Testmedien	36
4.6.1	Medium zur Stammhaltung	36
4.6.2	Wachstumsmedium zur Anzucht	36
4.6.3	Minimal-Produktionsmedium zum Stammscreening	37
4.6.4	B&S-Produktionsmedium	37
4.6.5	Standard-Produktionsmedium	38
4.6.6	Fermentationsmedium	38
4.7	Verwendete Mikroorganismen	39
5	Itaconsäureproduktion mit freien Zellen	40
5.1	Einführung	40
5.2	Stammscreening	43
5.3	Substratscreening	46
5.3.1	Substratscreening mit Kohlenstoffquellen auf der Basis nachwachsender Rohstoffe	47
5.3.1.1	Stärke und deren Abbauprodukte	47
5.3.1.2	Saccharose	50
5.3.1.3	Inulin	50
5.3.1.4	Rapsöl	51
5.3.1.5	Glycerin	51
5.3.2	Itaconsäurebildung auf Reststoffen der Landwirtschaft	52
5.3.2.1	Melasse	52
5.3.2.2	Sauermilchmolke	53
5.4	Einflussfaktoren auf die Itaconsäureproduktion	54
5.4.1	Itaconsäurefermentation im 1,8-L Fermenter zur Beurteilung von Wachstumsverhalten und Itaconsäurebildung des <i>Aspergillus terreus</i> 1963	54
5.4.2	Stickstoff / Phosphat- Verhältnis	63
5.4.3	Zusammenhang von Magnesiumbedarf, Biomassewachstum und Itaconsäureproduktion	65
5.4.4	Zusammenhang von Calciumbedarf, Biomassewachstum und Itaconsäureproduktion	66
5.4.5	Einfluss der Spurenelemente Vanadium, Molybdän, Bor, Kalium, Cobalt, Aluminium, Kupfer, Mangan, Zink und Eisen	68
5.4.6	Calcium / Zink / Kupfer- Verhältnis	77
5.4.7	Einfluss der Substratkonzentration	79
5.4.8	Einfluss der Produktkonzentration	81
5.4.9	Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Animpfmenge und Scherbeanspruchung auf die Itaconsäureproduktion	82
5.5	Itaconsäureproduktion mit freien Zellen des <i>Asp. terreus</i> NRRL 1963	83

6	Itaconsäureproduktion mit immobilisierten Zellen	85
6.1	Einleitung	85
6.2	Immobilisierung durch Adsorption	88
6.2.1	Itaconsäureproduktion mit Siliconträgern	88
6.2.2	Itaconsäureproduktion mit Sinterglas-Kugeln (Schott SIRAN®)	94
6.3	Immobilisierung durch Matrixeinschluß (PVAL)	97
6.3.1	Anpassung der Matrix an <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1963	98
6.3.1.1	Toxizitätstest Polyethylenglycol (PEG)	98
6.3.1.2	Toxizitätstest Polyvinylalkohol (PVAL)	100
6.3.1.3	Matrixzusammensetzung	101
6.3.2	Cryogel Perlen	102
6.3.2.1	Wachstum und Itaconsäureproduktion in Cryogel-Perlen	101
6.3.2.2	Einfluss der Perlengröße	105
6.3.2.3	Einfluss der Lagerung von Cryogel-Perlen	106
6.3.3	LentiKats®	107
6.3.3.1	Pilzwachstum und Einfluss der Anfangs-Sporenbeladung	107
6.3.3.2	Einfluss der Temperatur auf die Itaconsäurebildung in LentiKats®	113
6.3.3.3	Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge bei LentiKats®	114
6.3.3.4	Einfluss der Lagerung auf die Itaconsäurebildung in LentiKats®	118
6.3.3.5	Untersuchungen zum Substrateinfluss	119
6.3.3.6	Kontinuierliche Fermentation von immobilisiertem <i>Asp. terreus</i> NRRL 1963 in LentiKats® im 0,5-L-Fermenter	120
6.3.3.7.1	Einfluss der Verweilzeit	121
6.3.3.7.2	Einfluss der Sauerstoffversorgung	123
7	Zusammenfassung und Ausblick	125
8	Anhang	129
8.1	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	129
8.2	Abkürzungen und Formelzeichen	133
8.3	Bezugsquellen	134
8.4	Literaturverzeichnis	137

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Willke, T., Reimann, C., Welter, K., Vorlop, K.-D., 1997

Biokatalytische Konversion nachwachsender Rohstoffe. In: Symposium
Nachwachsende Rohstoffe - Perspektiven für die Chemie : Tagungsband, 213-217
Münster: Landwirtschaftsverlag

Reimann, C., Prüße, U., Welter, K., Wittlich, P., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1997

Stoffkonversion nachwachsender Rohstoffe durch einschlußimmobilisierte
Biokatalysatoren, VDI-Berichte 1356: 211-214

Welter, K., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1998

Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen.
Schr Nachwachsende Rohstoffe 10, 316-323. Münster: Landwirtschaftsverlag

Reimann, C., Welter, K., Prüße, U., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1998

Stoffkonversion nachwachsender Rohstoffe durch einschlußimmobilisierte
Biokatalysatoren. Agrartechnische Forschung 4 (2), 123-129

Welter, K., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1999

Production of itaconic acid by LentiKats®. Schr. Nachwachsende Rohstoffe 14, 520-
521, Münster: Landwirtschaftsverlag

Willke, Th., Welter, K., Vorlop, K.-D., 1999

Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen.
Abschlussbericht 95 NR 063-F 01.10.1995-30.06.1998. FAL, Braunschweig, 52
Seiten

Willke, Th., Welter, K., Vorlop, K.-D., 1999

Biotechnische Herstellung von Itaconsäure aus Zucker. Schr Nachwachsende
Rohstoffe 15, (im Druck), Münster: Landwirtschaftsverlag.

Welter, Kirsten, Willke, Thomas, Vorlop, Klaus-Dieter (1999): Biotechnische Produktion von
Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen, Abschlußbericht zum BML/FNR-
Projekt 95 NR 063-F

Tagungsbeiträge

Reimann, C., Welter, K., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1997

Microbial conversion of renewable resources to compounds for chemical industry.
(Poster) International Conference on Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry, 23.-27. Juni 1997, Braunschweig.

Reimann, C., Welter, K., Wittlich, P., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1997

Bioconversion of renewable resources. (Poster)
International Conference on Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry, 23.-27. Juni 1997, Braunschweig.

Welter, K., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1997

Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen
(Poster). 1. Workshop Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, 30. Juni –1. Juli 1997, Detmold

Reimann, C., Prüße, U., Welter, K., Wittlich, P., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1997

Stoffkonversion nachwachsender Rohstoffe durch einschlußimmobilisierte Biokatalysatoren (Vortrag). VDI-Tagung Landtechnik 16.-17. Okt. 1997, Braunschweig.

Welter, K., Thomsen, P., Willke, Th., Vorlop, K.-D., 1998

Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen
(Poster). 16. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, 26.-28. Mai 1998, Wiesbaden

Willke, Th., Welter, K., Vorlop, K.-D., 1999

Biotechnische Herstellung von Itaconsäure aus Zucker (Poster). 2. Workshop nachwachsende Rohstoffe, 14.-15. Okt. 1999, Braunschweig

1 Einleitung

Der heutige Rohstoffbedarf der chemischen Industrie wird immer noch zu 92 % aus Erdöl, Erdgas und Kohle gedeckt. Angesichts der in den nächsten Jahrzehnten knapper werdenden Ressourcen an fossilen Rohstoffen, ist es nötig, nach alternativen Rohstoffquellen Ausschau zu halten. Diese sollten einerseits im Sinne einer nachhaltigen Entwicklung möglichst regenerativ sein und andererseits eine befriedigende Substituierung von bisher auf petrochemischer Grundlage gewonnenen Produkten sicherstellen können.

Eine in diesem Zusammenhang interessante Verbindung ist die Itaconsäure (Synonym: Methylenbernsteinsäure). Die Itaconsäure (Abb. 1-1) ist eine einfach ungesättigte Dicarbonsäure, und bietet damit interessante Möglichkeiten für die chemische und pharmazeutische Industrie. Sie eignet sich aufgrund Ihrer besonderen Eigenschaften für vielfältige Anwendungen.

Aufgrund geringer Produktivitäten, mangelnder Prozeßstabilität und teurer Aufarbeitung besitzt die Itaconsäure einen hohen Preis und wird nur in begrenzten Mengen für Spezialitäten verwendet. Die aktuellen Kosten liegen bei ca. 5,4-7,2 DM/kg (Cargill Corp., Rhone Poulenc, Pfitzer USA, Iwata Chemical Co., Wuhan Chemicals Import & Export).

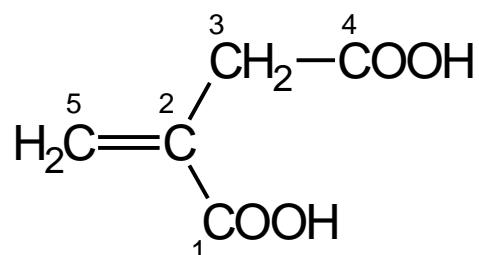


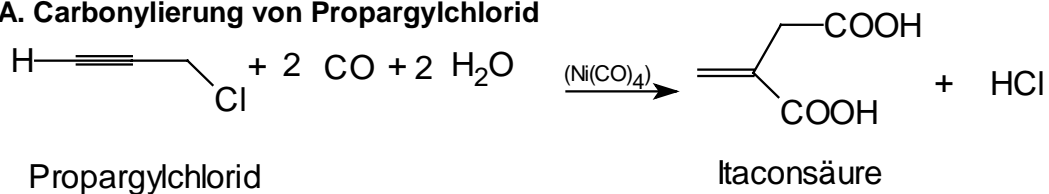
Abb. 1-1. Strukturformel der Itaconsäure

Herstellung der Itaconsäure:

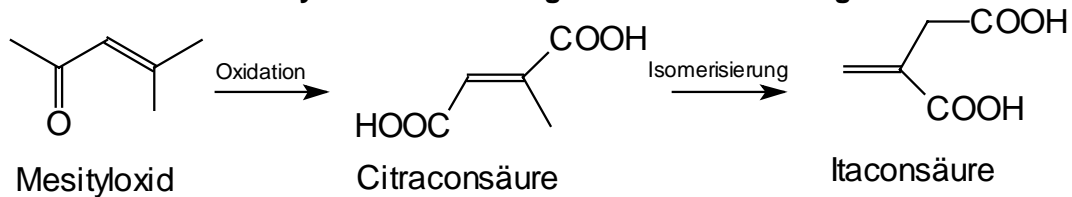
Itaconsäure kann sowohl chemisch als auch mikrobiologisch hergestellt werden. Entdeckt wurde die Itaconsäure 1837 durch Baup als Thermolyseprodukt der Citronensäure [Baup 1837]. Drei Jahre später stellte Crasso dieselbe Verbindung aus Aconitsäure her und gab ihr den davon als Anagramm abgeleiteten heutigen Namen [Luskin 1974]. Seither hat es viele Vorschläge einer chemischen Synthese gegeben, wie sie in Abbildung 1-2 aufgeführt sind, u.a. Carbonylierung von Propargylchlorid (Abb. 1-2A) [Chiusoli 1962], Oxidation von

Mesityloxid mit anschließender Isomerisierung der entstehenden Citraconsäure (Abb. 1-2B) [Berg & Hetzel 1978], Oxidation von Isopren (Abb. 1-2D) [Pichler et al. 1967] und nicht zuletzt die Thermolyse von Citronensäure (Abb. 1-2C) [Blatt 1943]. Eine chemische Synthese von Itaconsäure aus Citronensäure, wie z.B. von Carlsson et al. (1994) in überkritischem Wasser bei 345 bar und Temperaturen von über 250°C vorgeschlagen, erscheint zum einen wenig sinnvoll, da zur Zeit 100 % der Citronensäure fermentativ, hauptsächlich mit *Aspergillus niger*, hergestellt werden [Kubicek & Röhr 1986]. Der Reaktionsweg wäre gegenüber einer direkten biotechnologischen Herstellung der Itaconsäure unnötig verlängert. Zum anderen ist die Selektivität der chemischen Synthesen verhältnismäßig gering. Aus Citronensäure entstehen neben 35 % (mol/mol) Itaconsäure außerdem 41 % (mol/mol) Mesacon- und Citraconsäure sowie je 6 % (mol/mol) an Aceton und Essigsäure [Carlsson et al. 1994].

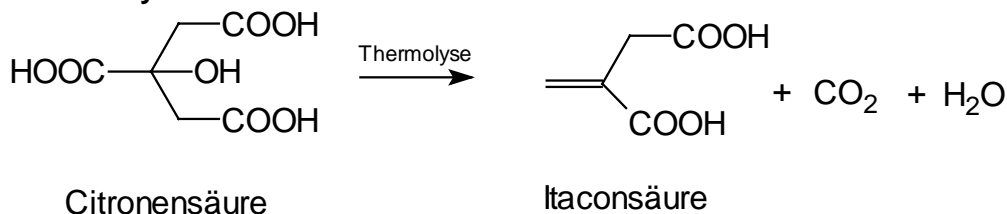
A. Carbonylierung von Propargylchlorid



B. Oxidation von Mesityloxid mit nachfolgender Isomerisierung



C. Thermolyse von Citronensäure



D. Oxidation von Isopren

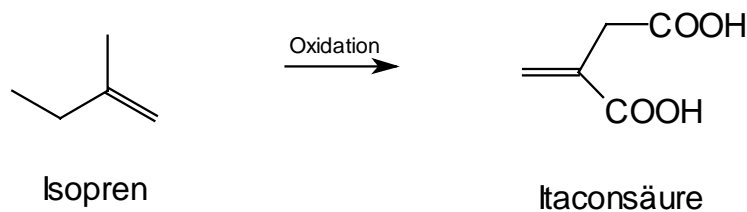


Abb. 1-2. Möglichkeiten der chemischen Synthese der Itaconsäure

Alle diese Verfahren konnten sich jedoch gegenüber der mikrobiologischen Produktion wirtschaftlich nicht durchsetzen [Tate 1981]. Seit der Entdeckung der mikrobiologischen Produktion mit *Aspergillus itaconicus* durch Kinoshita [Kinoshita 1932] fand die wesentliche

Entwicklung der Verfahren mit freier Pilzbiomasse bis 1966 statt. Danach verlor die Forschung vorübergehend für rund 15 Jahre das Interesse an der Weiterentwicklung, was sich in einem entsprechend spärlichen Schrifttum aus dieser Zeit äußert. Erst Anfang der 80er Jahre erfolgte eine neue Phase der Erforschung von Fermentationsverfahren, in deren Mittelpunkt nicht mehr nur die absatzweise Fermentation mit freien Zellen stand, sondern kontinuierliche Betriebsweise und Repeated-Batch-Verfahren mit vornehmlich immobilisiertem *Aspergillus terreus* Einzug hielten.

Mikrobiologische und biochemische Grundlagen:

Aspergillus terreus gehört zur Gattung *Aspergillus* (Gießkannenschimmel) der Plectomyce-ten, das sind Kleistothezienpilze. Ihr Konidienstadium ist ausgesprochen ausgeprägt. Das vielfach verzweigte vielkernige Mycel ist von einer großen Zahl von Konidienträgern besetzt. Diese entstehen einzeln auf den Hyphen, indem sich eine Hyphenzelle, die Fußzelle, verzweigt und eine senkrechte Hyphe bildet. Bei *Aspergillus* endet diese Hyphe in einer Blase, aus deren Oberfläche die Sterigmen herauswachsen. Aus den Sterigmen entstehen perl-schnurförmig hintereinander angeordnete Konidien (Abb. 1-3). Diese sind gefärbt und ver-leihen der Pilzkolonie die typische Färbung.

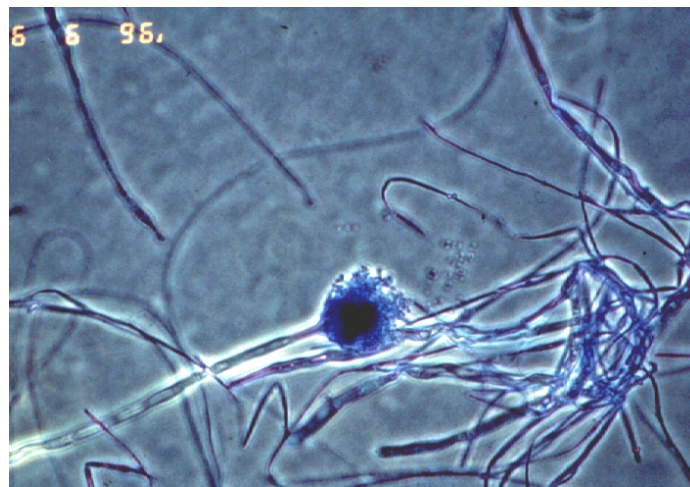


Abb. 1-3. Blase und Sterigmen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963

Itaconsäure wird von nur wenigen Stämmen von *Aspergillus terreus* aber auch von *Aspergillus itaconicus* gebildet. Seit der Entdeckung der mikrobiologischen Produktion mit *Aspergillus itaconicus* durch Kinoshita hat es einige Versuche gegeben, den Metabolismus der Itaconsäure aufzuklären. Kinoshita selbst schlug den in Abb.1-4 wiedergegebenen Weg vom Zucker über Glucon-, Citronen- und Aconitsäure vor, obwohl die Bedeutung der beiden zuletzt genannten Säuren für den allgemeinen, aeroben Energiestoffwechsel im Tricarbon-säurezyklus erst durch die grundlegenden Arbeiten von Krebs (1937) offenbar wurden

[Calam et al. 1939, Krebs & Johnson 1937]. Als im Jahre 1939 Calam et al. diese Ergebnisse bei *Aspergillus terreus* mit Hilfe von Produktionsexperimenten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen überprüften, kamen sie jedoch zu dem Schluss, dass die Citronensäure keine Vorstufe der Itaconsäure zu sein schien [Calam et al. 1939].

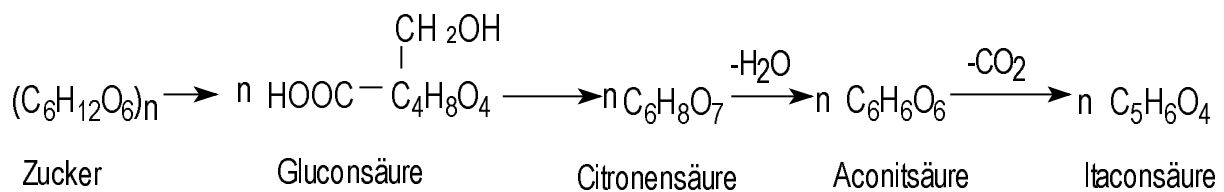


Abb. 1-4. Vorschlag der Biosynthese von Itaconsäure in *Aspergillus itaconicus* durch Kinoshita (1937) [nach Calam et al. 1939]

Nach der Aufklärung der Vorgänge um die Glykolyse in den 30er Jahren ergaben Anhäufungen von Pyruvat bei Versuchen mit Stoffwechsellinhibitoren wie Fluorid, Arsenat und Iodoacetat sowie der Nachweis von Aldolase-Aktivität im zellfreien Extrakt, dass Zuckermoleküle in *Aspergillus terreus* über den nach Embden, Meyerhof und Parnas benannten Stoffwechselweg bis hin zum Pyruvat abgebaut werden [Eimhjellen & Larsen 1955, Bentley & Thiessen 1957a, Winskill 1983].

Diese Auffassung wird durch neuere Untersuchungen mit $^{14}\text{C}_1$ - bzw. $^{14}\text{C}_6$ -markierter Glucose voll bestätigt, indem gezeigt wird, dass der Pentosephosphat-Weg bei der Itaconsäurebildung keine Rolle spielt, da für beide markierten Glucosevarianten gleiche spezifische Radioaktivitäten in der Itaconsäure gefunden wurden [Bonnarme et al. 1995]. Die von Kinoshita vorgeschlagene Gluconsäure hat folglich keinerlei Bedeutung bei der Itaconsäureproduktion.

Bestand über den glykolytischen Abbau des Zuckers bereits in den 50er Jahren ein weitgehender Konsens, so wurde der weitere Metabolismus, insbesondere die Rollen von Citronen- und *cis*-Aconitsäure, kontrovers diskutiert. Sowohl Experimente mit radioaktiv ^{14}C -markiertem Acetat bzw. Citrat [Corzo & Tatum 1953] als auch der Verbrauch von Citrat in Itaconsäure produzierenden *Aspergillus terreus* Kulturen [Eimhjellen & Larsen 1955] widersprachen eindeutig den Ergebnissen von Calam et al. (1939). Larsen & Eimhjellen leiteten daraus 1955 ab, dass eine aktivierte Form der Citronensäure die direkte Vorstufe der Itaconsäure sei. Dabei schlossen sie *cis*-Aconitsäure als Precursor aus, da sie bei Zugabe des Aconitase (E.C. 4.2.1.3)-Inhibitors Fluoroacetat (Abb. 1-5) sogar eine Zunahme der Itaconsäureproduktion beobachteten [Eimhjellen & Larsen 1955].

Diesen Effekt konnten Bentley und Thiessen (1957b) nur wenige Jahre später nicht bestätigen, denn das Fluoroacetat hemmte sowohl Wachstum als auch in starkem Maße die Itaconsäurebildung ohne allerdings die erwartete Anhäufung von Citrat zu bewirken.

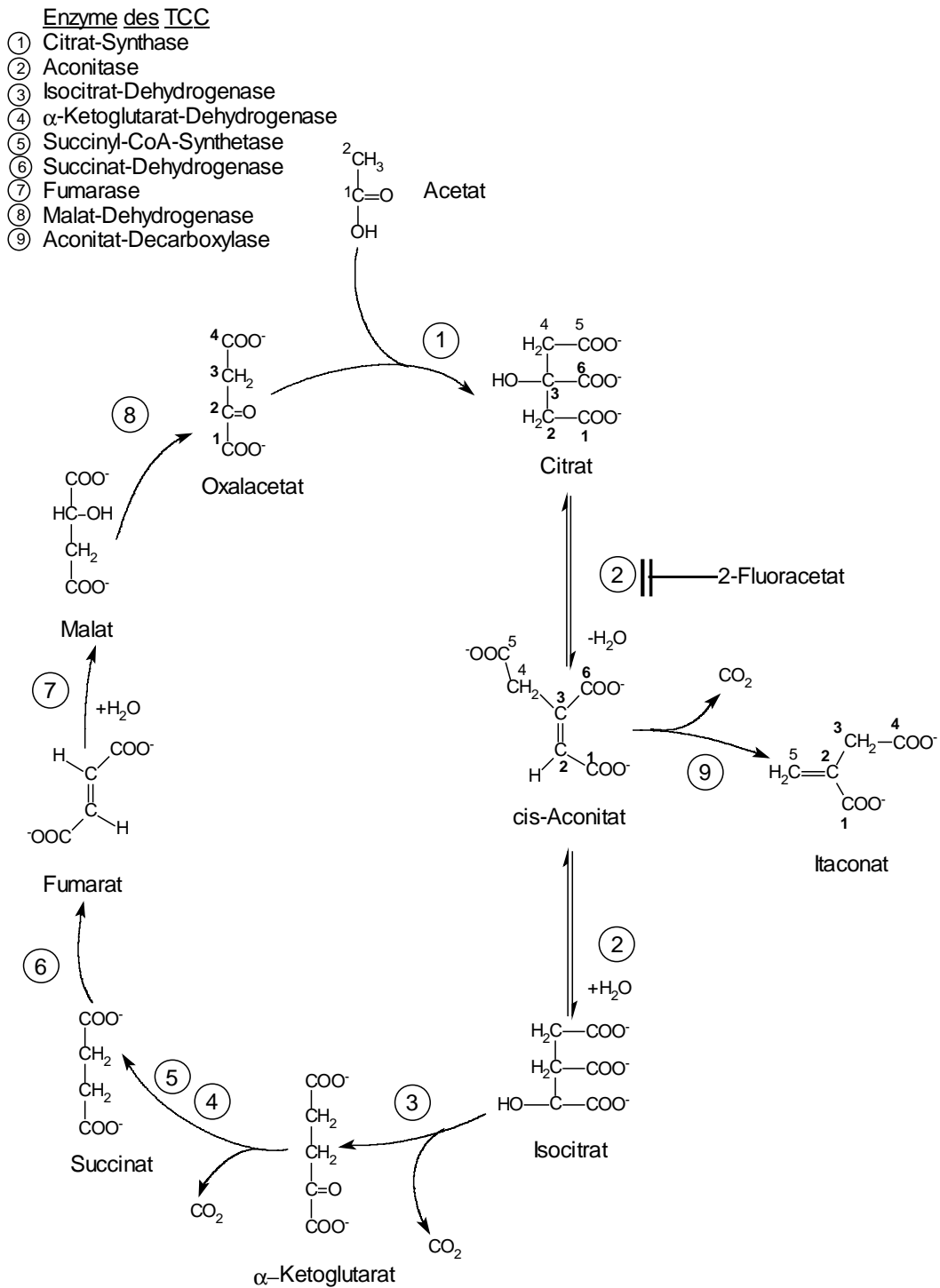


Abb. 1-5. Schematische Darstellung des TCC mit dem Itaconsäurebiosyntheseweg nach Bentley & Thiessen 1957a,b; Winskill 1983 und Bonnarme et al. 1995

Gleichwohl gelang ihnen ein wichtiger Schritt in der Aufklärung des Itaconsäuremetabolismus mit der Isolierung und teilweisen Aufreinigung eines die Itaconsäure synthetisierenden Enzyms aus zellfreiem Extrakt von *Aspergillus terreus*. Wie sich herausstellte, handelte es sich um die Aconitat-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.6), die *cis*-Aconitsäure in Kohlendioxid und Itaconsäure umsetzt [Bentley & Thiessen 1957c]. Mit radioaktiv markiertem $^{14}\text{C}_1$ -Acetat und Methylen- ^{14}C -Succinat bzw. Carboxyl- ^{14}C -Succinat konnten Bentley & Thiessen (1957a) zeigen, dass die aus dem Acetat stammende Carboxylgruppe bei der Umwandlung des *cis*-Aconitats in Itaconsäure als Kohlendioxid abgespalten wird. Die Abbildung 1-5 zeigt den Tricarbonsäurezyklus mit dem sich aus den hier erwähnten Versuchen ergebendem Biosyntheseweg der Itaconsäure.

Winskill untersuchte 1983 mit Hilfe von isolierten Mitochondrien aus *Aspergillus terreus*, ob der Tricarbonsäurezyklus (TCC) an der Itaconsäurebildung beteiligt ist und fand dabei alle Enzymaktivitäten des TCC vor. Außerdem konnte er zeigen, dass die Aktivität der Isocitrat-dehydrogenase, von der er die NADP-abhängige Form (E.C. 1.1.1.42) nachwies, während der Produktionsphase auf 1/40 im Vergleich zu dem Wert in der Wachstumsphase des Pilzes abnahm. Gleichzeitig war eine leichte Zunahme der Citrat-Synthase-Aktivität zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Enzyme entscheidend mit der Regulation der Überproduktion von Itaconsäure zusammenhängen.

Den letzten Beweis für die Richtigkeit des TCC-Wegs konnten Bonnarne et al. (1995) erbringen, indem sie den Itaconsäuremetabolismus erstmals vollständig in freien *Aspergillus*-Zellen untersuchten. Dabei kam das Repertoire moderner Techniken zum Einsatz wie Massenspektrometrie, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und wiederum ^{14}C -Radiomarkierung. Die in der Itaconsäure wiedergefundenen ^{13}C - und ^{14}C -Markierungen stimmen mit den gemäß dem TCC-Weg berechneten theoretischen Werten sehr gut überein. Außerdem konnten weder Citramalsäure noch 1,2,3-Tricarboxypropansäure nachgewiesen werden.

Angeichts der Ergebnisse aus 65 Jahren Forschung lässt sich zusammenfassend zum Metabolismus der Itaconsäure in *Aspergillus* sagen, dass die Zuckermoleküle zunächst glykolytisch bis zum Pyruvat abgebaut werden, um dann im TCC wie in Abbildung 1-5 gezeigt, über Citronen- und *cis*-Aconitsäure zur Itaconsäure umgesetzt zu werden. Wenn andere, zusätzliche Synthesewege auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden können, so scheinen doch v.a. die jüngeren Arbeiten nahezulegen, dass diesem in den Grundzügen schon von Kinoshita 1932 vorgeschlagenen und von Bentley & Thiessen (1957b), Winskill (1983) wie Bonnarne (1995) bestätigten Syntheseweg mit Abstand die größte Bedeutung zukommt.

Verwendung der Itaconsäure:

Im Kunststoffbereich dient die Itaconsäure vor allem als **Co-Monomer**, das in zugesetzten Mengen von 1-5 % den Co-Polymerisaten besondere Eigenschaften verleiht. So führt ein Zusatz von 2 % Itaconsäure zu einem Co-Polymerisat aus 95 % Vinylidenchlorid und 5 % Methylacrylat zu einer bereits mit kochendem Wasser hitzeversiegelbaren Beschichtung, wie sie insbesondere auf Cellophan oder PET-Folien im Lebensmittel- oder Photobereich üblich sind [Luskin 1974]. Bei Papierbeschichtungen zum Zwecke besserer Haftung von Schreibfarbe kommen **Co-Polymerisate** aus Metacrylsäureestern und Itaconsäure zum Einsatz, wobei die Itaconsäure die Adhäsion zwischen Beschichtung und Papierfasern verbessert.

Die Förderung der adhäsiven Eigenschaften steht beim Einsatz in Latexlackfarben (z.B. Styrol / 2-Ethylhexylacrylat / Itaconsäure 56 / 43,5 / 0,5) im Vordergrund, bei denen die Itaconsäure eine hervorragende Abriebfestigkeit der Farbstoffe auf den Latexteilchen bewirkt [Luskin 1974]. Ein großer Einsatzbereich sind Styrol / Butadien / Itaconsäure-Co-Polymerisate als Bodenbeschichtungen von Teppichen und Auslegeware, bei denen die Itaconsäure zu elastischen Eigenschaften und guter Bodenhaftung entscheidend beiträgt [Luskin 1974]. Itaconsäure / Acrylsäure-Co-Polymerisate im Zusammenhang mit polyvalenten Kationen weisen bei hoher Beständigkeit gegen Druck, bei guter Biokompatibilität und guter Haftfähigkeit hervorragende Voraussetzungen für den Einsatz als Dentalzemente in der Zahnmedizin auf [Tate 1981].

Ein weiteres Einsatzgebiet von Itaconsäurederivaten ist die Herstellung von **Detergenzien und Hilfsstoffen**. Das aus der Reaktion von Itaconsäure mit Aminen hergestellte Pyrrolidinderivat findet als Verdicker in Schmierfetten oder als Detergenz Verwendung [Bigelis & Arora 1992]. Bei pH 10-11 besitzt Natriumpolyitaconat ein doppelt so hohes Komplexieungsvermögen für Calciumionen wie Natriumtri(polyphosphat) [Luskin 1974] und stellt so eine Alternative zu phosphatfreien Wasserenthärtungsanlagen dar. Es wird vermutet, dass sulfoniertes Natriumpoly(itaconat) der wesentliche Bestandteil des Reinigungsmittels Citrex® ist [Anonymus 1970], das für die Entfernung von Farb-, Öl-, und Beschichtungsresten auf Glasfasern, Epoxidharzen und Metallen empfohlen wird. Die schnelle biologische Abbaubarkeit und toxikologische Unbedenklichkeit machen es den ansonsten in diesen Bereichen eingesetzten halogen- oder kresolhaltigen Reinigungsmitteln überlegen [In Tech 1998].

Neuerdings wird die Itaconsäure sowohl im **Pflanzenschutz** als auch im **pharmakologischen Bereich** eingesetzt. Als Wachstumsregulator kann sie das Wurzelwachstum beschleunigen [Finkelstein & Bull 1992]. Versuche mit einer Vielzahl an Itaconsäurederivaten bescheinigen einigen Verbindungen eine gewisse entzündungshemmende und peripher schmerzstillende Wirkung, die einen zukünftigen Einsatz als nichtsteroidales, in den Prostaglandinstoffwechsel eingreifendes Antiphlogistikum möglich erscheinen lässt [Bagavant et al. 1994]. Diese Beispiele legen nahe, dass in Zukunft mit weiteren Einsatzmöglichkeiten in den unterschiedlichsten Bereichen zu rechnen ist.

1.1 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Verwendung von Itaconsäure gewinnt zunehmend an Bedeutung. Aufgrund der hohen Kosten wird Itaconsäure jedoch bisher nur in begrenzten Mengen für Spezialitäten verwendet.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Grundlagen für die Entwicklung und Etablierung eines kostengünstigen biotechnologischen Verfahrens zur industriellen Herstellung von Itaconsäure aus preisgünstigen nachwachsenden Rohstoffen unter Verwendung optimierter Prozessbedingungen und unter Verwendung eines optimierten Biokatalysators zu schaffen.

Wesentliche Aspekte der Arbeit waren:

- ein Screening nach geeigneten Itaconsäurebildnern und ein Screening nach geeigneten Rohstoffquellen der Landwirtschaft als Substrate für die Itaconsäureproduktion,
- die Entwicklung und Optimierung analytischer Methoden zur Bestimmung von Substraten und Produkten,
- eine Optimierung des Produktionsmediums hinsichtlich hoher Produktivität und Ausbeute bei geringem Biomassewachstum,
- die Immobilisierung durch Adsorption und Einschluss, sowie ein Vergleich der Immobilisierungsmethoden im Hinblick auf hohe Produktivität und Ausbeute sowie Stabilität der Katalysatoren,
- die Entwicklung und der Aufbau von Testständen zur Charakterisierung freier und immobilisierter Zellen,
- der Vergleich verschiedener Verfahren zur Itaconsäureproduktion (Batch-, Repeated-Batch-, Kontinuierliche Fermentation).

2 Nachwachsende Rohstoffe

„Nachwachsende Rohstoffe (NR) haben eine grundsätzliche Bedeutung für unsere Zukunft. Dies gilt für alle Bereiche unseres Lebens. Der heimischen Landwirtschaft könnte der Anbau nachwachsender Rohstoffe zur industriellen und energetischen Nutzung neue Einkommenschancen eröffnen. Industrie und Handel können mit umweltfreundlichen Produkten aus diesen Rohstoffen Ihre Zukunftsfähigkeit in der sozialen Marktwirtschaft beweisen. Die Verbraucher werden in die Lage versetzt, sich durch gezielte Nachfrage nach derartigen Produkten aktiv im Umweltschutz zu engagieren und zur Vermeidung von Umweltbelastungen auf Basis fossiler Rohstoffe beizutragen.“

Jochen Borchert 1997

Bundesminister für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

Eine Kommission der Vereinten Nationen unter der Leitung der norwegischen Ministerpräsidentin Gro Harlem Brundtland stellte in Ihrem Abschlussbericht 1987 den Begriff „sustainable development - nachhaltige Entwicklung“ als die neue Dimension zur dauerhaften Lösung der globalen Umweltprobleme heraus. Dieser Begriff wurde von der „UNO-Konferenz für Umwelt und Entwicklung“ 1992 in Rio de Janeiro aufgegriffen und in die Weltöffentlichkeit verbreitet. Seither sieht man die nachwachsenden Rohstoffe vor allem als einen Beitrag zur kreislauforientierten und umweltverträglichen Wirtschaftsweise.

Unter nachwachsenden Rohstoffen versteht man Pflanzen oder deren Inhaltstoffe und Tiere, die ganz oder in Teilen als Rohstoffe für die Industrie oder als Energieträger genutzt werden können. Im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen erneuern sie sich jährlich oder in überschaubaren Zeiträumen. Die Natur produziert weltweit jährlich schätzungsweise 170 Mrd. Tonnen Biomasse. Davon nutzt der Mensch lediglich ca. 6 Mrd. Tonnen wirtschaftlich, und zwar zu je einem Drittel als Holz, als Getreide und als Zuckerrohr, Rüben, Gemüse sowie Öl- und Hülsenfrüchte.

Betrachtet man die industrielle Chemie, die es erst seit etwa 150 Jahren gibt, so ist festzustellen, dass in der Anfangsphase durchaus nachwachsende Rohstoffe und fossile Rohstoffe parallel genutzt wurden. Dennoch basierte der große Aufschwung, der gegen Ende des vorigen Jahrhunderts einsetzte, überwiegend auf der Nutzung fossiler Rohstoffe.

Durch die Ölkrisen in den späten siebziger Jahren und die durch die Verteuerung und Verknappung des Erdöls ausgelöste Suche nach Alternativen zu den fossilen Rohstoffen rückten die nachwachsenden Rohstoffe mehr und mehr in das Blickfeld von Öffentlichkeit und der Politik. In den achtziger Jahren begann die systematische Beschäftigung mit den nachwachsenden Rohstoffen.

Diesmal kam die Motivation aus der Landwirtschaft. Ausschlaggebend dafür waren die Nahrungsmittelüberschüsse. Es wurden erste Projekte zur Herstellung von Ethanol als Fahrzeugtreibstoff aus einheimischen Pflanzen wie Zuckerrüben, Kartoffel und Getreide durchgeführt. Die zunehmende Diskussion über Umweltprobleme wie den Treibhauseffekt, steigende Abfallmengen und die Übernutzung fossiler Ressourcen kam als Motiv für die Beschäftigung mit nachwachsenden Rohstoffen hinzu.

Ein bedeutender Vorteil nachwachsender Rohstoffe liegt darin, dass sie zur Schonung endlicher Ressourcen beitragen. Wichtig ist auch, dass die Verwendung nachwachsender Rohstoffe weitgehend Kohlendioxidneutral ist, weil bei ihrer Verbrennung oder biologischen Umsetzung nur soviel CO₂ freigesetzt wird, wie während ihrer Synthese aufgenommen wurde. So können fossile Rohstoffe wie Erdöl und Kohle durch Materialien aus der Land- und Forstwirtschaft umweltverträglich substituiert werden.

Nachwachsende Rohstoffe gewinnen zunehmend an Bedeutung. Dadurch kann sich der relative Anteil am Rohstoffbedarf der beispielsweise für die chemische Industrie in Deutschland bei derzeit etwa 10% bzw. 1,8 Mio t des Rohstoffvolumens liegt, in Zukunft überproportional entwickeln.

Betrachtet man die Rohstoffe, die für den hohen Anbauumfang von Nichtnahrungspflanzen verantwortlich sind, fallen in erster Linie zwei sehr dynamische Sektoren ins Auge. Zum einen steigt der Anbau der Stärkepflanzen Kartoffel und Weizen für den Nichtnahrungsmittelbereich seit Jahren stetig an. Zum anderen hat sich die Verwendung von Rapsöl in der Oleochemie in den letzten Jahren am Markt etabliert.

Es liegt also nahe, die Methoden der Natur zu nutzen, um jährlich von der Natur via Land- und Forstwirtschaft bereitgestellte Rohstoffe - also nachwachsende Rohstoffe - wie

- Zucker aus Zuckerrüben,
- Stärke aus Kartoffeln, Mais und Weizen,
- Pflanzenöle aus Ölsaaten,
- Lignocellulose aus Holz,
- landwirtschaftliche Reststoffe, wie Melasse, oder Molke

in technische Produkte wie z.B. der Itaconsäure und anderer Produkte zu überführen.

2.1 Stärke

Der Einsatz von Stärke als nachwachsender Rohstoff im chemisch-technischen Verwendungsbereich hat eine lange Tradition. Stärke steht in großen Mengen und hoher chemischer Reinheit als Industrierohstoff zu günstigen Preisen zur Verfügung.

Sehr viele Pflanzen speichern Stärke. Allein 99% der weltweiten Stärkeerzeugung entfallen auf nur vier Rohstoffe: Mais, Kartoffeln, Tapioka und Weizen. Das Universalprodukt Stärke wird in Europa nahezu ausschließlich aus Mais, Kartoffeln und Weizen nach unterschiedlichen, rein physikalischen Verfahren gewonnen.

Chemisch ist Stärke aus Glucoseeinheiten aufgebaut. Stärke besteht aus zwei strukturell verschiedenen Bestandteilen, nämlich aus Amylose und Amylopektin. Amylose ist kettenförmig aufgebaut, aus durchschnittlich 250 bis 1.000 Glucoseeinheiten (GE). Sehr stark schwankend ist der Polymerisierungsgrad von Amylopektin: Durchschnittlich aus 1.000 bis zu 100.000 GE aufgebaut. In der Pflanze sind Amylopektin und Amylose sowie teilweise Begleitstoffe wie Wasser, Protein und Lipide zu dreidimensionalen, in für die jeweilige Pflanzenart charakteristischen, teilkristallinen Stärkekörnern verteilt.

Man unterscheidet native Stärken, modifizierte Stärken und Verzuckerungsprodukte.

- Native Stärke ist die gereinigte, fabrikmäßig gewonnene Stärke. Sie dient in erster Linie als Ausgangsprodukt für eine Reihe von physikalischen oder chemischen Folgereaktionen, die eine Vielzahl von Produkten liefert (Füllstoff in Papier und Pappe, Kleister, Klebstoff).
- Modifizierte Stärken entstehen durch die Behandlung mit Hitze, Säuren, Alkalien, Oxidationsmitteln oder Enzymen. Hierzu gehören Dextrine, dünnkochende Stärken, oxidierte Stärken etc. .
- Durch eine sorgfältig gesteuerte saure Hydrolyse erfolgt ein Abbau der Stärke zu Zuckergemischen definierter Zusammensetzung, den Glucosesirupen, oder bis zur Dextrose (Traubenzucker). Der DE-Wert (DE = Dextrose-Einheit) gibt dabei die durchschnittliche Anzahl von Glucoseeinheiten im Oligosaccharid an.

Der bedeutenste Einsatzbereich von Stärke ist der Bereich Papier und Pappe, der etwa 60 % der technischen Stärkeverwendung ausmacht. Der zweitwichtigste Einsatzbereich ist die Verwendung von Stärke als biotechnischer Rohstoff. Diesem Sektor wird ein starkes Wachstum zugesprochen. 1992 gingen bereits rund 130.000 t Stärke in diesen Bereich.

In der Biotechnologie werden Stärke, Dextrine und Stärke-Hydrolysate als Kohlenstoffquellen für Mikroorganismen in Fermentationsverfahren zur Herstellung von organischen Säuren, Antibiotika, Aminosäuren und Vitaminen verwendet.

Preispolitik:

Die Stärkeproduktion steigt in Deutschland wie auch der EU kontinuierlich an. Der Preis nativer Stärken für den Einsatz im technischen Bereich bewegt sich je nach Sorte und Abnahmemenge in der Größenordnung zwischen 0,80 und 1,00 DM/kg (persönliche Mitteilung durch die Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe, Gülzow 2000). Gefördert wird die Stärkenutzung für Noon-Food-Zwecke durch die 1986 auf EU-Ebene erlassenen Regelungen zur Stärkeindustrie, die einen Einsatz im chemisch-technischen Sektor zu Weltmarktpreisen ermöglicht. Die landwirtschaftliche Produktion wird dabei durch Ausgleichszahlungen an die Weltmarktsituation angepasst.

Die Preise für modifizierte Stärken wie auch von Verzuckerungsprodukten liegen in Abhängigkeit von Veredelungsgrad und Menge zum Teil deutlich darüber. Die durchschnittlichen jährlichen Zuwachsraten in der deutschen Stärkeproduktion lagen in den letzten 50 Jahren bei etwa 9%. Das Stärkepreisniveau wird weltweit durch den Maispreis bestimmt.

2.2 Zucker

In der Chemie bezeichnet man Saccharose (Zucker) als Disaccharid, als Zweifachzucker, bestehend aus einem Molekül Glucose und einem Molekül Fructose.

Zucker wird in der EU und in Deutschland fast ausschließlich aus Zuckerrüben gewonnen. Um Zucker kostengünstiger erzeugen zu können, werden Anbau- und Züchtungsversuche mit anderen zuckerhaltigen Pflanzen durchgeführt (z.B. Zuckerhirse, Topinambur, Zichorie).

Die Zuckerrübenanbaufläche betrug in der EU 1989/1999 1.988.000 ha und in Deutschland 501.000 ha. Der durchschnittliche Zuckerertrag in der EU lag 1989/1999 bei 8,1 t/ha (in Dtl. 8,0 t/ha) (Langendorf, 1999). Etwa der 1/70 Teil der produzierten Zuckerrüben wird als Industrierohstoff verwendet, alles andere wird als Lebensmittel und für Getränke verbraucht (Benz, Scharf, Weber, 1997). Die chemischen Eigenschaften von Zucker machen ihn aber auch als Rohstoff für industrielle Zwecke interessant.

Momentan findet man auf dem Markt nur wenige Produkte, die aus Zucker als Industrierohstoff hergestellt werden, und dies, obwohl die technischen Eigenschaften Produkten auf Erdölbasis nicht nachstehen und die ökologischen Vorteile wie geringerer CO₂-Ausstoß und gute biologische Abbaubarkeit auf der Hand liegen. Der Grund ist der leider immer noch höhere Preis dieser Produkte.

Die fermentative Umsetzung von Zucker ist das größte industrielle Anwendungsgebiet des Zuckers. Viele Mikroorganismen bilden in ihrem Stoffwechsel Substanzen aus nachwachsenden Rohstoffen, die als Industrieprodukte genutzt werden können. Oft handelt es sich

dabei um Moleküle, die chemisch gar nicht, nicht rein genug oder nur unter erheblichem Aufwand zu synthetisieren sind.

In Zukunft werden in Bezug auf Effektivität und Leistung nicht nur Mikroorganismen natürlicher Herkunft, sondern auch genetisch veränderte Organismen in der Fermentationstechnologie eine entscheidende Rolle spielen.

Preispolitik:

Der Zuckermarkt in der EU und der Weltmarkt für Zucker sind in der Regel von Überschüssen geprägt. Seit 1950 hat es nur zweimal kurzfristig Angebotsverknappungen auf dem Weltmarkt gegeben. Die Stärke- und Zuckerregelung in der EU ermöglicht es der Industrie seit 1986, den Zucker zu weltmarktähnlichen Bedingungen (Produktionserstattung für bestimmte chemisch-technische Erzeugnisse) zu beziehen. Dadurch vergrößert sich der Absatz von Zucker im chemisch-technischen Sektor. Die wichtigste Voraussetzung für die verstärkte Verwendung von Zucker, die Verbilligung des Rohstoffs auf Weltmarktniveau, ist mit der neuen Chemiezuckerregelung inzwischen zum Teil gegeben (Benz, Scharf, Weber, 1997). Der Preis für Rohzucker liegt z.Z. (1999/2000) bei 106,30 DM/100kg, der Preis für Weißzucker ohne Produktionserstattung liegt bei 127,50 DM/100 kg und mit Produktionserstattung (41,963 EUR/t) bei 108 DM/100 kg (Langendorf, 1999).

Fermentative Prozesse mit nachwachsenden Rohstoffen im technischen Sektor sind auch heute noch eher die Ausnahme. Die vergleichsweise geringe Anwendung biotechnologischer Methoden in der Chemischen Industrie ist begründet in

- fossilen Rohstoffen,
- erfolgreichen petrochemischen Methoden,
- sehr niedrigen Energiepreisen.

Fossile Rohstoffe sind jedoch begrenzt und ihre Nutzung belastet das Weltklima. Nachwachsenden Rohstoffen kommt deshalb eine besondere Bedeutung zu. Ein signifikanter Anstieg der eingesetzten Mengen ist jedoch zumindest kurz- und mittelfristig nicht in Sicht. Petrochemische Rohstoffe, insbesondere Erdöl, behalten für uns auch in naher Zukunft eine dominante Bedeutung.

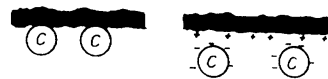
Die Strategie bei der Verwendung nachwachsender Rohstoffe muss es sein, die Synthesovorleistung der Natur effizient zu nutzen. Dies gelingt insbesondere bei fermentativen Prozessen oder in Stoffumwandlungen unter Einbehaltung der natürlichen Strukturelemente. Die Einsatzmöglichkeiten nachwachsender Rohstoffe, die preislich und technisch möglich sind, werden schon weitestgehend realisiert.

3 Zellimmobilisierung

Die Konkurrenzfähigkeit der Itaconsäure auf dem Weltmarkt hängt von Ihrer Qualität und bei vergleichbarer Qualität entscheidend vom Preis ab. Wettbewerbsfähige Produkte im Niedrigpreis-Bereich sind nur mit einem einfachen und störungsfreien Verfahren im großtechnischen Maßstab zu erzielen. Eine Möglichkeit stellt die Immobilisierung (Fixierung) der Pilze an oder in einem Träger dar.

Unter Immobilisierung versteht man die Fixierung von Mikroorganismen, Zellen oder Enzymen durch Adsorption, kovalente oder ionische Quervernetzung sowie durch Einschluss in Kapseln und Gele. Zu den Einschlussverfahren zählen neben der Mikroverkapselung und dem Einsatz von Membranreaktoren vor allem die verschiedenen Geleinschlussverfahren [Vorlop et al. 1987]. Bei diesen Verfahren werden Enzyme oder ganze Zellen in einer Gelmatrix immobilisiert (Abb. 3-1).

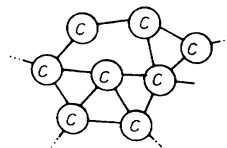
Adsorption



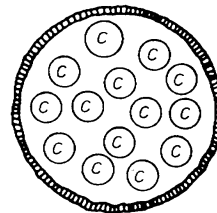
Kovalente Anbindung



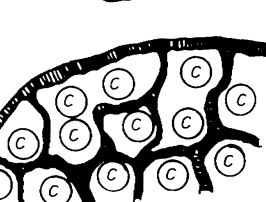
Quervernetzung



Verkapselung



Mikroverkapselung



Einschluß

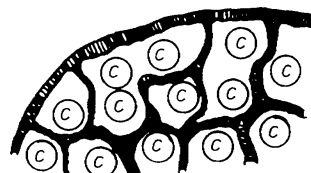


Abb. 3-1. Immobilisierung von Zellen, Enzymen und Mikroorganismen

Ziel einer Immobilisierung ist es, die Biokatalysator-Konzentration im Reaktor zu erhöhen, sowie die Biomasse besser zurückhalten zu können und ggf. vor unphysiologischen Einflüssen zu schützen. Dadurch ist es prinzipiell möglich eine bessere Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) gegenüber Verfahren mit frei suspendierter Biomasse zu erreichen. Das führt zu kleineren Reaktoren, zur Verringerung der Prozessdauer, und damit zur gewünschten Kostenreduzierung.

Durch eine Immobilisierung wird die "katalytische Wirkung" in größere Partikel verlagert, was ihre Rückhaltung im Reaktor oder Abtrennung aus der Fermenterbrühe stark erleichtert. Im Idealfall kann im Downstream-processing auf die Abtrennung der Biomasse verzichtet werden.

Mit einer Immobilisierung ergeben sich allgemein folgende Vorteile:

- Erhöhung der Biomassekonzentration im Reaktor und damit gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeuten,
- Schutz vor mechanischem und physiologischem Stress,
- verbesserte Langzeitstabilität,
- einfache Abtrennung der Biomasse vom Produktstrom mit der Möglichkeit des wiederholten Einsatzes im absatzweisen Betrieb,
- die Möglichkeit der kontinuierlichen Prozessführung,
- Verbesserung der Lagerungs- und Transporteigenschaften,
- unsterile Betriebsweise bei Einschlussverfahren.

3.1 Adsorptions-Immobilisierung

Die Adsorption ist die älteste und zugleich einfachste Immobilisierungsmethode. Bereits 1823 verwendete man an Holzspänen adsorbierte Zellen zur Essigsäure-Herstellung. Geeignet sind eine Vielzahl von Trägermaterialien, wie z.B. Aktivkohle, poröse Partikel aus Glas, Keramik, Polyethylen, Polystyrol, Polyurethan und Silicon.

Die Adsorption ist die Bindung an eine Oberfläche, die keine speziellen funktionellen Gruppen für eine kovalente Bindung enthält. Die Adsorption ist reversibel.

Adsorptionsverfahren bieten folgende Vorteile:

- Der Aufwuchs bzw. die Adsorption geschieht von selbst. Es genügt, den Träger mit der wachsenden Biomasse in Kontakt zu bringen.
- Bei Verwendung natürlicher Trägermaterialien bereitet die Entsorgung keine Schwierigkeiten, sofern die Biomasse nicht pathogen oder genetisch verändert ist.

Demgegenüber stehen folgende Nachteile:

- Die Materialien zeigen mehr oder weniger großen Abrieb, einhergehend mit einem Verschleiß der berührenden Anlagenteile. Bedingt durch den Abrieb sind Verstopfungen nicht ausgeschlossen.
- Die Adsorptionskräfte zwischen Zelle und Träger sind oft gering, so dass es zu einer Auswaschung der Zellen kommen kann. Bei unsterilem Betrieb kommt es häufig zur Überwucherung durch Kontaminationen.
- Eine ausreichende Langzeitstabilität bei kontinuierlicher Prozessführung ist nur unter gleichbleibend günstigen Bedingungen gegeben. Physiologischer Stress (pH, Temperatur, toxische Substanzen) führen zur Ablösung der adsorbierten Organismen und damit zum Verlust der Biomasse.

Pilze können an inerten Oberflächen gut anhaften. Diese Eigenart lässt sich beim Züchten von Pilzen unter Laborbedingungen häufig beobachten. Was auf der einen Seite störend empfunden wird (Haftfreudigkeit des Pilzmycels an Fermenterteilen oder Kulturgefäßen, gleichgültig ob gerührt oder geschüttelt wird) ist für die Immobilisierung von Pilzen durch Adsorption von großem Vorteil. Die Haftfreudigkeit von Pilzen, z.B. an Schnüren, lässt sich beispielsweise in sogenannten Schnurreaktoren nutzbringend einsetzen. Man kann Pilze auch an drehbaren Scheiben anhaften lassen und auf diese Weise Drehscheiben-Reaktoren betreiben. Die Scheiben als Trägermaterialien bestehen z.B. aus Glas, Kunststoff oder anderen Materialien. Das Wachstumsverhalten von *Aspergillus niger* auf rotierenden Scheiben ist eingehend untersucht worden, vor allem im Hinblick auf die Produktion organischer Säuren [Wainwright, 1995].

Pilze lassen sich auch auf kleinen, inerten Partikeln immobilisieren, die dann in einem Rührkessel oder Fließbettreaktor eingesetzt werden. Für das Immobilisierungsmaterial entscheidend ist ein hohes inneres Porenvolumen. Über Kapillarkräfte werden die Sporen schnell in die Perlen eingezogen. In der Produktion werden z.B. häufig Kieselgurperlen (Celite) verwendet. Der Pilz *Penicillium chrysogenum* wurde z.B. zur Penicillinproduktion in Celite immobilisiert [Wainwright 1995]. Auch *Aspergillus terreus* NRRL 1960 wurde bereits zur Itaconsäureproduktion in Celite immobilisiert [Kautola et al 1985].

3.2 Einschluss-Immobilisierung

Beim Einschluss in eine Matrix werden die Biokatalysatoren in ein polymeres Netzwerk eingeschlossen, das für die Biokatalysatoren undurchlässig ist, die Diffusion von Substrat und Produkt jedoch ermöglicht. Einschlussverfahren haben gegenüber den reinen Adsorptionsverfahren den Vorteil des besseren Schutzes der Mikroorganismen vor Abrieb und Desorption und führen damit zu einer Stabilisierung des Prozesses. Neben dem Schutz vor

mechanischem Stress durch zu große Scherbeanspruchung und vor Hemmstoffen sind vor allem die Möglichkeit einer unsterilen Prozessführung und die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute Vorteile der Einschluss-Immobilisierung. Hochelastische bzw. poröse Materialien ermöglichen außerdem ein nachträgliches Wachstum innerhalb der Matrix. Bei geeigneten chemischen und mechanischen Eigenschaften der Einschlussmatrix ist Wachstum und Koloniebildung der immobilisierten Mikroorganismen im Gel möglich. Die dadurch bedingten Aktivitätssteigerungen können beträchtlich sein. Es ist daher möglich, die Immobilisierung mit einer geringen Anfangsbeladung durchzuführen und die fertigen Immobilisate in Wachstumsmedium zu inkubieren.

Den Vorteilen der Einschluss-Immobilisierung stehen häufig eine geringere Aktivität der immobilisierten Biomasse und ein zusätzlicher Transportwiderstand durch die umgebende Gelmatrix als Nachteile gegenüber. Der Stofftransport eines Substrates zum Biokatalysator besteht aus dem externen Stofftransport und dem internen Stofftransport.

Der Stofftransport aus freier Lösung an die Katalysatoroberfläche ist abhängig von der Relativgeschwindigkeit des Katalysators zum Medium und damit mit Hilfe der Reaktorwahl und der Rührung des Systems beeinflussbar und daher in vielen Fällen vernachlässigbar.

Der Transport im Katalysator ist dagegen abhängig von den Diffusionseigenschaften der Matrix und setzt sich im Detail aus den Diffusionseigenschaften der Matrix und den Biomasse-Kolonien zusammen. Der negative Einfluss des zusätzlichen Transportwiderstandes durch die umgebende Gelmatrix spielt bei geeigneten Geleigenschaften und geringer Größe der Immobilisate für die Diffusion von niedermolekularen Stoffen eine untergeordnete Rolle. Die durch die Immobilisierung hervorgerufenen Nachteile der einzelnen Zelle wird durch die hohe Zelldichte überkompensiert. Die Reduktion der Partikelgröße $< 1 \text{ mm}$ ist vom ökonomischen Standpunkt aus betrachtet die z.Z. sinnvollste Methode, Diffusionslimitierungen im Immobilisat zu minimieren. Im Vergleich zu frei suspendierten Zellen in wässrigen Lösungen sind die Zellen aufgrund von Diffusion im Immobilisat substratlimitiert. Zur Einschluss-Immobilisierung werden daher Hydrogele mit hohem Wassergehalt und hoher Porosität bevorzugt, die ähnliche Diffusionskoeffizienten wie wässrige Lösungen aufweisen [Scott et al 1989].

Der Katalysatorwirkungsgrad kennzeichnet die Effektivität des Katalysators. Die Aktivität des eingeschlossenen Biokatalysators (Zellen, Enzyme, usw.) ist abhängig von der Versorgung mit Substrat sowie im Falle einer Produktlimitierung auch vom Abtransport des lokal gebildeten Produktes und somit stofftransportabhängig. Der Katalysatorwirkungsgrad ist daher das Verhältnis der gemessenen Aktivität der eingeschlossenen Biokatalysatoren zur Aktivität der Biokatalysatoren ohne Stofftransporteinfluss.

Beim Einschluss aktiver Zellen kann auch ein teilweises Auswachsen aus dem Immobilisat nicht komplett vermieden werden. Verhindert werden kann der Austritt der Zellen in das Medium durch den Einsatz gecoateter Einschlussimmobilisate [Tanaka et al 1989, Vorlop et al 1987].

Ein bekanntes Geleinschlussverfahren ist die Immobilisierung in Alginatkugeln durch ionotrope Gelbildung. Es werden aber auch weitere natürlichere Polymere wie Chitosan, Pektin oder κ -Carrageenan als Einschlussmatrizes verwendet. Natürliche Polymere haben den Vorteil, dass sie gegenüber Zellen nicht toxisch sind. Ihnen mangelt es aber häufig an ausreichend langen Standzeiten, da diese Biokatalysatoren nur unzureichende mechanische Stabilitäten aufweisen. Außerdem sind sie als Naturstoffe gegen einen biologischen Abbau nicht ausreichend geschützt und daher in vielen Bereichen nicht einsetzbar. Aufgrund der geringen mechanischen Stabilität in Wirbelbett- und Rührreaktoren und der biologischen Abbaubarkeit natürlicher Polymere sind eine Vielzahl synthetischer Hydrogele zur Einschluss-Immobilisierung entwickelt worden.

Synthetische Hydrogele zeichnen sich durch geringe biologische Abbaubarkeit und hohe mechanische Stabilität aus. Jedoch gelieren nur wenige synthetische Hydrogele ohne den Zusatz toxischer Vernetzer durch Temperaturänderung der wässrigen Polymerlösung. Ein Beispiel ist das in dieser Arbeit verwendete thermoreversible Hydrogel Polyvinylalkohol (PVAL).

Polyvinylalkohol (PVAL) ist ein technisches Produkt und preisgünstig zu erhalten. Die Herstellung von PVAL erfolgt durch radikalische Polymerisation von Vinylacetat und nachfolgendes Abspalten der Acetatreste durch Alkoholyse unter alkalischen Bedingungen [Hoechst AG 1991]. Die Verwendung von PVAL als Immobilisierungsmatrix für Zellen ist noch relativ jung. Es wird vor allem als Beschichtungsmaterial von Papier und Folien, sowie im medizinischen Bereich genutzt.

Grundvoraussetzung für den Einsatz von PVAL zur Einschluss-Immobilisierung von Zellen ist, dass PVAL nicht toxisch gegenüber Mikroorganismen ist. Es kann daher auch im Lebensmittelbereich sowie im Health-Care-Bereichen eingesetzt werden. PVAL-Hydrogele besitzen ein breites Einsatzspektrum zwischen pH 1 und 11 und sind nutzbar für die Umsetzung bei Temperaturen bis zu 70°C [Watase et al. 1983, Lozinsky et al 1986]. PVAL zeichnet sich desweiteren durch hohe Elastizität und leichte Verarbeitung aus. Die PVAL-Hydrogele bestehen zu über 90 % aus Wasser und haben daher sehr gute Diffusionseigenschaften für die Substrate und Produkte der Mikroorganismen. Gele aus PVAL besitzen hervorragende mechanische Eigenschaften, die durch Zugabe verschiedener Zusatzstoffe in weiten Grenzen variiert werden können [Vorlop und Remmers 1991, Lozinsky et al. 1995]. Der Zusatz von Polyolen wie dem des Polyethylenglykol beeinflusst sowohl die Gelbildung als auch die Geleigenschaften [Lozinsky et al. 1995].

Gelöstes kurzkettiges PVAL ist in geringen Konzentrationen unter aeroben Bedingungen durch *Sphingomonas* abbaubar. Ein biologischer Abbau von PVAL-Gelen ist bislang nicht bekannt.

Hochelastische und mechanisch stabile PVAL-Hydrogele werden durch das wiederholte Einfrieren und kontrollierte Auftauen einer wässrigen PVAL-Lösung gebildet („freezing-thawing method“) [Lozinsky et al. 1986, Ariga et al. 1987, Vorlop und Remmers 1990, Vorlop und Remmers 1991, Lozinsky et al. 1995]. Bei dieser Methode entstehen Immobilisatperlen durch Eintropfen der zellbeladenen Polymerlösung in eine tiefkalte Flüssigkeit [Vorlop und Breford 1994, Prüße et al 1998]. Die für das schnelle Durchfrieren erforderlichen tiefen Temperaturen sind für die Immobilisierung von Biokatalysatoren problematisch. Neben der begrenzten Auswahl geeigneter Kühlmedien und den Kosten für die Temperierung in einem späteren Prozess stellt vor allem die Kälteempfindlichkeit der einzuschließenden Biomasse ein Problem dar. Bei der Gelbildung nach Freeze-Thaw-Methode werden keine weiteren Hilfsstoffe eingesetzt, die toxisch auf die Mikroorganismen wirken können.

In einem neu entwickelten Verfahren erfolgt die Gelierung zum PVAL-Hydrogel ohne die Verwendung toxischer Vernetzer bei Raumtemperatur. Eine Beschleunigung der Gelierung zu PVAL-Hydrogelen bei Raumtemperatur wird durch den Zusatz von Polyethylenglycolen und anschließendem Trocknungsvorgang bis zu einer definierten Restfeuchte erzielt. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Verkürzung der Gelierung von bisher mehreren Stunden auf Zeiträume zwischen 10-20 Minuten und ermöglicht somit das Scale-Up in den industriellen Maßstab. Während des Trocknungsprozesses bildet sich eine Emulsion mit Mikrophasen angereicherter, organischer Komponenten und Mikrophasen hoher PVAL-Konzentration, so dass eine poröse Struktur entsteht [Jekel 1999]. Zur Formgebung der PVAL-Hydrogele ist eine Gelierung in vorgefertigten Formen nicht notwendig. In einer sehr einfachen Vorgehensweise wird die Polymersuspension auf einen ebenen Untergrund getropft und in einem Zeitraum von maximal 20 Minuten im Luftstrom bis zu einer definierten Restfeuchte getrocknet. Die nach dem Rückquellen im wässrigen Medium erhaltenen PVAL-Hydrogele sind linsenförmig (LentiKats[®]). Mit Durchmessern von 2-4 mm ist eine Abtrennung aus dem Medium einfach. Mit LentiKats[®] können interne Diffusionslimitierungen aufgrund der geringen Höhe von 200-400 µm minimiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Analytik

4.1.1 Glucose- und Itaconsäurebestimmung durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Für den quantitativen wie qualitativen Nachweis des Substrates Glucose, der Itaconsäure, sowie der Nebenprodukte wird ein Ionenausschluss-HPLC-System mit UV- und Brechungsindex (RI)-Detektion benutzt. Die Abbildung 4-1 gibt das Blockschaltbild der Ionenausschluss-HPLC wieder. Die Betriebsparameter dieses auf kombinierten, komplexen Trennmechanismen wie Ionenaustausch, Permeation, Ionenausschluss und hydrophoben wie hydrophilen Interaktionen beruhenden Verfahren (BIO-RAD 1995) sind in der Tab. 4-1 zusammengestellt. Verbindungen mit π -Elektronensystemen, wie die Itaconsäure sind leicht im UV-Detektor bei 210 nm nachzuweisen, während im RI-Detektor fast alle Verbindungen ein Signal verursachen. Wegen des erheblich höheren Signalpegels wird für die quantitative Bestimmung der Itaconsäure das UV-Signal genutzt, während Glucose im RI-Detektor bestimmt wird.

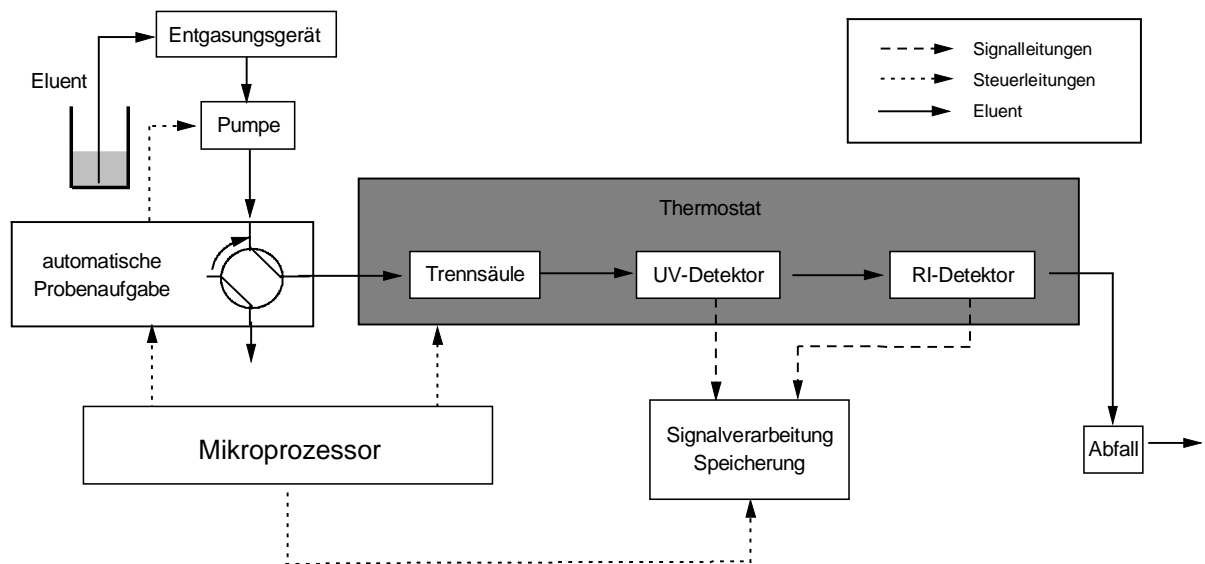
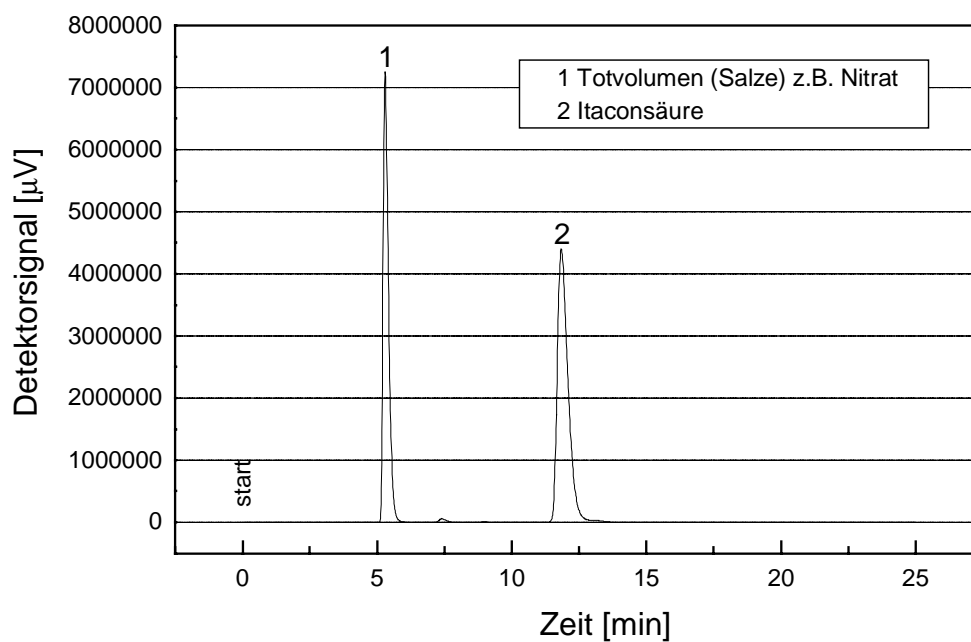


Abb. 4-1. Blockschaltbild der Ionenausschluss-HPLC

Tab. 4-1. Betriebsbedingungen der Ionenausschluss-HPLC (Klammerwerte: Schnelltest)

Eluent	5 mM H ₂ SO ₄ in Wasser
Probenvolumen	50 µl
Flussrate	0,7 (0,8) mL/min
Stationäre Phase	Aminex [®] HPX-87H
Säulen	300 (60), 7,8 mm
Säulentemperatur	60 °C
Detektoren	UV-Detektion bei 210 nm, RI-Detektor
Temperatur der Detektoren	35°C
Auswertung	Integrator , PC

Vorteile dieses Verfahrens liegen in der hohen Langzeitstabilität, im preiswerten Laufmittel und einem breiten Analysenspektrum. Die Abbildung 4-2 zeigt ein Chromatogramm der Ionenausschlusschromatographie aus einer Fermentation.

**Abb. 4-2. Beispielchromatogramm des UV-Kanals**

4.1.2 Ammoniumbestimmung durch Fließinjektionssystem (FIA)

Der quantitative Ammoniumnachweis wird mit einem Fließinjektionssystem mit on-line-Derivatisierung durchgeführt, das aus einer auf 60°C temperierten Edelstahlkapillare mit nachgeschaltetem UV-Detektor besteht. Unter den durch 2-Mercaptoethanol gewährleisteten, reduzierenden Reaktionsbedingungen reagieren die Ammoniumionen mit o-Phtaldialdehyd zu einem spektroskopisch bei 410 nm detektierbaren Farbstoff. Die Abbildung 4-3 gibt das Blockschaltbild des FIA-Systems zum Ammoniumnachweis wieder. Die Betriebsparameter sind der Tabelle 4-2 zu entnehmen.

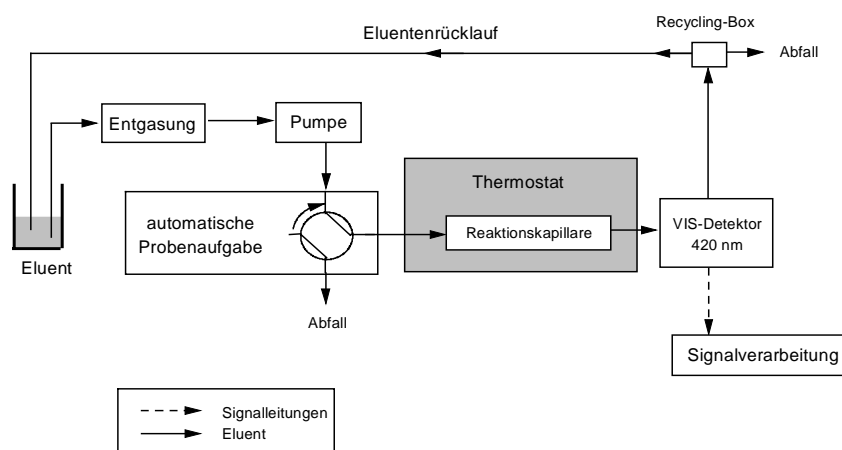


Abb. 4-3. Blockschaltbild des FIA-Systems zum Ammoniumnachweis

Nähere Einzelheiten sind bei Goyal et al. (1988) zu finden. Die 1:100 mit 5%igem Methanol verdünnten Proben werden durch einen Autosampler aufgegeben, die Auswertung geschieht mit einem kombinierten Integrator / Drucker anhand einer mit definierten Ammoniumkonzentrationen festgestellten Kalibrierkurve.

Tab. 4-2. Betriebsbedingungen der Ammonium-HPLC

Laufmittel	100 mM KH_2PO_4 / 100 mM K_2HPO_4 / 2 mM 2-Mercaptoethanol/ 10 mM o-Phtaldialdehyd in Wasser
Probenvolumen	20 μL
Flussrate	2 mL/min
Reaktionskapillare	60°C
UV-Detektion bei	$\lambda = 410 \text{ nm}$
Auswertung	Integrator

4.1.3 Nitratbestimmung durch Ionenchromatographie

Zum quantitativen Nitratsnachweis wird eine Reversed-Phase HPLC Säule mit UV-Detektion bei 210 nm benutzt. Die hydrophobe Kohlenwasserstoffkette des im Laufmittel befindlichen Octylamins interagiert mit dem ebenfalls hydrophoben Säulenfüllmaterial, während die bei dem pH-Wert von 6,5 größtenteils ionisiert vorliegende Aminogruppe mit den Nitratanionen wechselwirkt. Das Octylamin dient somit als Ionenpaarreagenz. Der Phosphatanteil im Laufmittel sorgt als Puffer für einen konstanten pH-Bereich. Die Abbildung 4-4 gibt das Blockschaltbild des HPLC-Systems für die Nitratanalytik wieder.

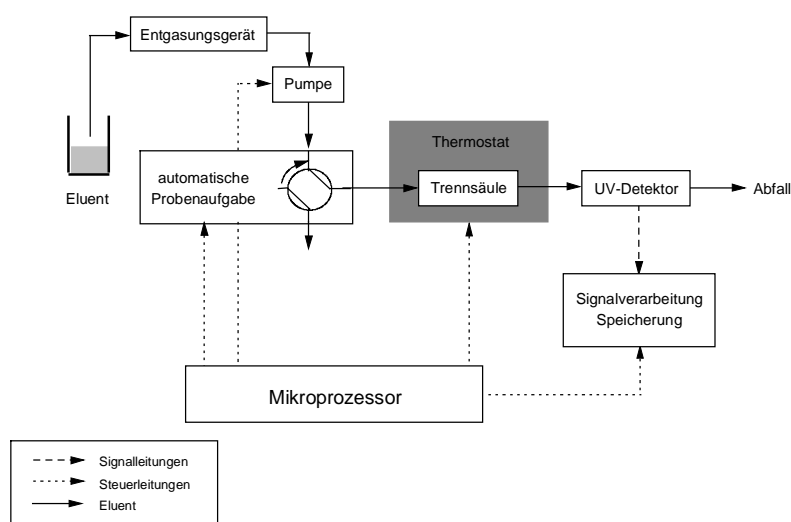


Abb. 4-4. Blockschaltbild des HPLC-Systems für die Nitratanalytik

Die Retentionszeit des Nitrats einer 1:10 verdünnten Probe liegt bei knapp 2 Minuten. Da auch das Produkt Itaconsäure mitdetektiert wird und nach ca. 13 Minuten unter Umständen durch einen breiten Peak den Nitratpeak einer Folgeprobe überdecken kann, muss die Laufzeit verlängert werden. Die Betriebsparameter sind der Tabelle 4-3 zu entnehmen.

Tab. 4-3. Betriebsbedingungen der Nitrat-HPLC

Eluent	5 % MeOH, 0,2 % Octylamin in Wasser, pH 6,5 mit H ₃ PO ₄
Säule	Hypersil ODS, 3 mm, 60 X 4,6 cm
Flussrate	2 mL/min
Probenvolumen	20 µL
Laufzeit	4,5 Minuten
UV-Detektion bei	λ=210 nm
Rechner	LC10-System

4.1.4 Phosphatbestimmung durch photometrische Messung

Die herkömmlichen, handelsüblichen Schnelltests (z.B. Dr. Lange LCK 349 oder Merck 14842 Spekτροquant) sind für den Nachweis kleinerer Phosphatkonzentrationen (<100 mg/L) in Gegenwart höchster Nitratkonzentrationen (>3000 mg/L) und hoher Ammoniumkonzentrationen (ca. 1000 mg/L), wie sie in den in dieser Arbeit verwendeten Medien vorkommen, wegen einer Querempfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen ungeeignet. Eine Anpassung der Schnelltests, z.B. durch Maskierung der störenden Anionen an die besonderen Erfordernisse des Phosphatnachweises in Fermentationsproben war nicht möglich.

Für den Nachweis von Phosphat in Düngemitteln und Bodenproben stehen leistungsfähige, allgemein anerkannte, spektrophotometrische Nachweisverfahren zur Verfügung. In einem Vorversuch mit unbeimpftem Medium, das verschiedene Phosphatkonzentrationen enthielt, erwies sich die ansonsten vor allem in der Bodenkunde angewandte Methode nach John (1970) als geeignet.

Der Phosphatnachweis nach John (1970) beruht auf der Bildung von Molybdat-Phosphatverbindungen, die durch Ascorbinsäure zu einem blauen Komplex reduziert werden. Die Zusammensetzung der für diesen Nachweis erforderlichen Stammlösung ist wie folgt:

Verbindung	Konzentration
Ammoniummolybdat	10 g/L Wasser
Kaliumantimonoxidentartrat	0,25 g/L Wasser
Schwefelsäure konz.	138,7 mL/L Wasser

Die für jeden Messtag frisch anzusetzende, gebrauchsfertige Reaktionslösung entsteht durch Zugabe von $1,5$ g/L Ascorbinsäure. Ein Aliquot der Probe wird mit der Reaktionslösung versetzt und mit Wasser aufgefüllt, geschüttelt und 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Danach wird die Absorption bei 882 nm gegen einen Nullwert ohne Probe, aber mit den Reagenzien bestimmt. Die Phosphatkonzentration ergibt sich aus dem Vergleich mit einer aufgestellten Kalibrierreihe.

Um Matrixeffekte durch den Einfluss der ionischen Bestandteile des Mediums auf den Phosphattest zu untersuchen, wurden definierte Phosphatkonzentrationen mit verschiedenen Mengen an Mineralmedium ohne Phosphat versetzt und die Messergebnisse miteinander verglichen. Bei Anwesenheit von 20 mL Mineralmedium pro Liter Analyselösung wurde ein die Messungen verfälschender Effekt festgestellt, der sich in einer über den Messbereich

erstreckenden, gleichmäßigen positiven Nullpunktverschiebung äußert, d.h. es wurde mehr Phosphat angezeigt, als vorhanden war. Bei den hier untersuchten anderen Konzentrationen an zugesetztem Mineralmedium war dieser Effekt so nicht eindeutig identifizierbar. Die Farbstoffbildung wird durch die Anwesenheit der Mineralmediumpkomponenten beschleunigt. Aus diesen Ergebnissen heraus wird die Empfehlung abgeleitet, den Einfluss verschiedener Mengen an phosphatfreiem Mineralsalzmedium auf den Phosphatnachweis nach John (1970) zu testen.

• Einfluss der Eigenfärbung des Mediums auf den Phosphattest

Mit zunehmender Fermentationszeit trat eine vermehrte gelbe bis bräunliche Färbung des Mediums auf. Sowohl der Nullpunkt als auch die Empfindlichkeit des Phosphattests wurden durch die Anwesenheit des alten Mediums stark verändert. An Bedeutung gewinnen könnten die beobachteten Phänomene aber, wenn aufgrund von erneuter Phosphatzufuhr, z.B. in Fed-Batch oder kontinuierlichen Kulturen eine Phosphatbestimmung unter den Matrixbedingungen eines alten Mediums durchgeführt werden muss. Es sind in diesem Teil dann möglichst hohe Probenverdünnungen zu wählen, um etwaige durch Mediumseigenfärbung oder Stoffwechselprodukte des Pilzes hervorgerufene Matrixeffekte abzuschwächen.

• Linearität des Messbereichs

Um zu überprüfen, ob von einer Linearität des spektrophotometrischen Messergebnisses im interessierenden Zeitraum der Fermentation ausgegangen werden kann, wurde eine Reihe von Standardadditionsexperimenten durchgeführt (Abb. 4-5).

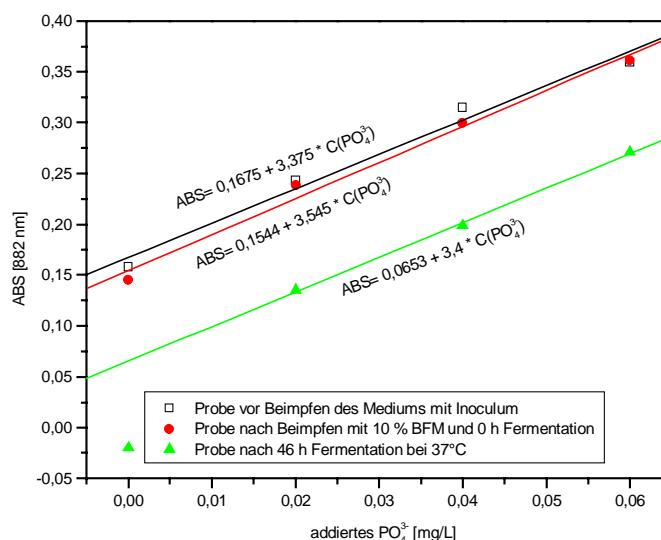


Abb. 4-5. Ergebnisse des Phosphattests nach John (1970) bei Standardaddition verschiedener Phosphatmengen zu Fermentationsproben unterschiedlicher Zeitpunkte

Im Analysekolben wurden zu jeder dieser Proben Phosphatmengen als Standardadditionen hinzugefügt, die den PO_4^{3-} -Konzentrationen 0; 0,02; 0,04 und 0,06 mg/L entsprechen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-5 wiedergegeben und zeigt, dass sich die Steigungen der durch die Messreihen gelegten Regressionsgeraden kaum voneinander unterscheiden. Der negative Absorptionswert bei der Probe nach 46 h Fermentation und einer Phosphataddition von 0 mg/L macht physikalisch keinen Sinn und ist als Fehlmessung aufzufassen. Dies bedeutet, dass ungeachtet aller Veränderungen eine Linearität im interessierenden Messbereich bis zur 50. Fermentationsstunde angenommen werden kann

4.1.5 Biomassebestimmung durch gravimetrische Methoden

4.1.5.1 Biotrockenmasse (BTM)

Die Bestimmung der Biotrockenmasse findet durch Vakuumfiltration einer Zellsuspensionsprobe über einem Polyamidfilter (0,45 μm) mit nachfolgendem Waschen mit aqua dem. statt. Die Filtration erfolgte in einem Filtrationsgerät der Fa. Schleicher & Schüll. Der vor der Filtration getrocknete Filter wurde bei 105°C für mindestens 24 h getrocknet. Die getrockneten Proben sind im Exsikkator über Silicagel bis auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend in geschlossenen Gefäßen gewogen worden. Die BTM-Konzentration wurde anschließend aus der gravimetrischen Bestimmung errechnet.

4.1.5.2 Biomassebestimmung in den Immobilisaten

Der Biomassegehalt der Immobilisate wurde durch Trocknung von etwa 0,2 g Immobilisat bei 105°C für 24 h bestimmt. Die Masse des Rückstandes, verringert um den nicht flüchtigen Polymeranteil, ergibt die Biotrockenmasse des Immobilisats.

4.1.6 Spurenelementebestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie

Zur Vorbereitung der Proben für die Atomabsorptionsspektroskopie wurden die anorganischen Trockenrückstände der Medien in salpetriger Säure aufgenommen und in 250 mL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt (Thomsen, P. 1998). Die Atomabsorptionsspektroskopie der sauren Lösung erfolgte mit ICP-OES 6500 (Perkin-Elmer, Überlingen).

4.2. Abtrennung der Biomasse

4.2.1 Zentrifugation

Ernten und Waschen des Mycels aus Fermenterbrühen: Bevor freie Biomasse zum Animpfen von Versuchsansätzen oder im Reaktor eingesetzt wurde, wurde sie aufkonzentriert und vom Wachstumsmedium abgetrennt. Die Abtrennung bzw. Ernte größerer Mengen Biomasse erfolgte mit einer Heraeus-Biofuge durch Zentrifugation bei 2253 g bei 20°C über einen Zeitraum von 15 Minuten. Das Pellet wurde anschließend in 0,9 %ige Kochsalzlösung resuspendiert. Dadurch wird ein Auswaschen des Wachstumsmediums erreicht.

Zentrifugation zur Probenvorbereitung: Die Klärung zellhaltiger Proben für HPLC-Untersuchungen erfolgte mit einer Variofuge (Fa.Heraeus, Hanau) durch Zentrifugation bei 15000 x g in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur.

4.2.2 Absatzweise Filtration

Filtration zur Trockenmassebestimmung: Die Filtration von Fermenterinhalt zur Trockenmassebestimmung erfolgte in einem Filtrationsgerät der Fa. Schleicher & Schüll unter Verwendung von PA-Filtern: Sartolon 25006-4/N von Sartorius, Göttingen.

Sterilfiltration von Lösungen: Lösungen von Mediumsbestandteilen, die nicht hitzesterilisiert werden konnten, wurden direkt durch sterile Einmal-Spritzfilter mit 0,22 µm mittlerer Porenweite filtriert.

4.3 Immobilisierung

4.3.1 Adsorption auf Siliconträgern und auf Siranglas-Kugeln

Vorbereitung des Trägermaterials: Zur Erhöhung der Benetzbarkeit wurden 2 g der porösen Siliconträger RTV-2 (raumtemperaturvernetzendes 2-Komponentensystem) [Bettin et al 1997] in einer stark verdünnten Tensidlösung (fit, fit-GmbH) gewaschen und sterilisiert. Nach der Sterilisation der Träger wurde mehrmals mit sterilem deionisiertem Wasser gespült. Erst dann wurde angeimpft. Die Porosität der Träger lag bei 70 % mit folgender Porengrößenverteilung: 80 % 100-200 µm und 20 % < 100 µm. Das von der Fa. Schott, Mainz hergestellte Trägermaterial Siranglas (SIKUG 012), wurde vor der Zugabe der Biomasse in deionisiertem Wasser sterilisiert. Bei dem porösen Sinterglas handelt es sich um poröse Glaskugeln von 2mm Durchmesser.

Aufzucht der Biomasse im Trägermaterial: Beide Trägermaterialien wurden zur Anzucht mit 100 mL Wachstumsmedium, welches bereits Pilzsporen enthielt (10^3 - 10^4 Sporen/mL), in 250 mL Erlenmeyerkolben versetzt und bei 37°C und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 Upm im Dunkeln inkubiert. Das Trägermaterial mit der adsorbierten bzw. aufgewachsenen Biomasse wurde nach 5 d zur Produktion der Itaconsäure in Standard-Produktionsmedium überführt.

4.3.2 Einschluss in cryogelierte Polyvinylalkohol-Perlen und linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®)

4.3.2.1 Immobilisierung in cryogelierte Polyvinylalkohol-Perlen

Vorbereitung des Einschluss-Liquid: Die Herstellung der Polyvinylalkohol-Perlen erfolgt durch Einwaage der entsprechenden Mengen an Polyvinylalkohol (PVAL 17-99), Polyethylenglycol (PEG 1000) und voll entsalztem Wasser [Zu 2g PVAL (17-99) und 1,2g Polyethylenglycol (PEG 1000) werden 16,8g Wasser gegeben]. Anschließend wird die Lösung solange bei 90°C erhitzt, bis alle Komponenten vollständig gelöst sind, so dass eine viskose, farblose Lösung erhalten wird. In dem Fluidanteil ist neben PEG und Wasser auch das Volumen der Sporensuspension von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 berücksichtigt. Die Zugabe der Pilzsporen erfolgte bei Temperaturen zwischen 30 und 37°C.

Herstellung der Polyvinylalkohol-Perlen: Die Immobilisate wurden mit einer an der FAL Braunschweig, am Institut für Technologie entwickelten Apparatur (Abb.4-6) hergestellt [Vorlop und Breford. 1994]. Mit dem Strahlschneider können große Mengen an Immobilisat mit Partikelgrößen zwischen 500-2000 µm hergestellt werden [Prüße et al. 1998].

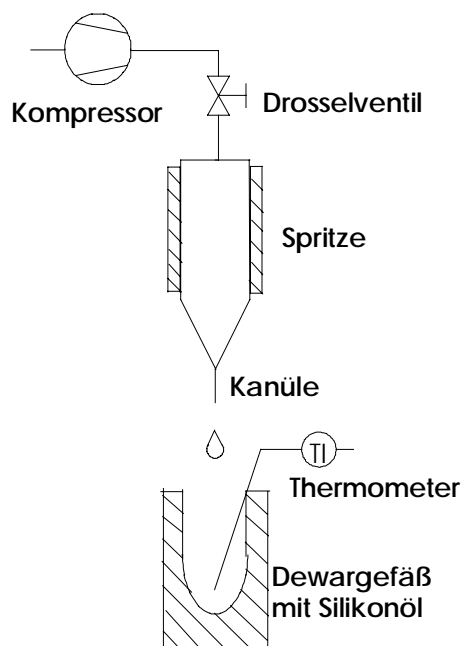


Abb. 4-6. Schematische Darstellung der Immobilisierungsapparatur

Die produzierten Perlen (Abb. 4-7) fallen in Siliconöl mit Temperaturen bei -50°C bzw. -15°C und gefrieren beim Sinken auf den Boden des Isoliergefäßes. Die gefrorenen Perlen wurden nach etwa 1 Stunde dem Siliconöl entnommen und in einem Dewar langsam aufgetaut.

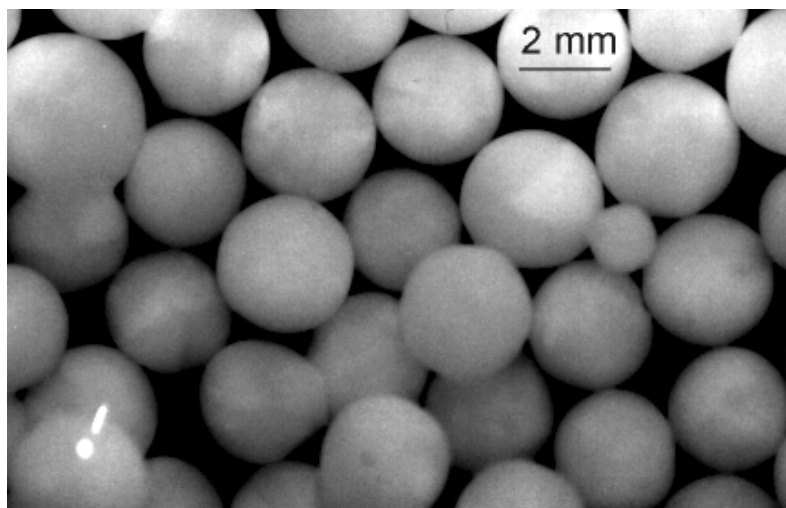


Abb. 4-7. Cryogelierte PVAL-Perlen

Alternativ dazu wurden die Perlen unmittelbar nach dem Abtropfen entnommen und in eine Auftauapparatur überführt in der die Immobilisate beginnend bei der Einfriertemperatur mit einer konstanten Auftaurate von 2°C pro Stunde auf 1°C erwärmt wurden. Nach dem Auftauen wurden die Immobilisate zunächst grob vom anhaftenden Öl befreit und mehrmals in

steriler isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Beim Waschen über mehrere Analysensiebe wurden zu große Perlen, Aggregate von Perlen sowie winzige Satellitenperlen abgetrennt. Die Perlen wurden anschließend mit Mineralsalzmedium überschichtet und konnten so über mehrere Wochen bei 5°C im Kühlschrank gelagert werden, bevor sie zur Fermentation eingesetzt wurden. Vor Einsatz der Perlen im Produktionsmedium wurden die Sporen im Wachstumsmedium in den Perlen angezogen

4.3.2.2 Immobilisierung in linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®)

Die Vorbereitung des LentiKat®-Liquid für die linsenförmigen PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®) erfolgte genauso wie bei der Herstellung der cryogelierter Polyvinylalkohol-Perlen beschrieben (Einwaage der entsprechenden Mengen an PVAL 17/99, PEG 1000 und vollentsalztem Wasser). Die mit Pilzsporen vermischte PVAL-Lösung wurde anschließend mit dem LentiPrint (kleinere Mengen) oder der LentiKat®-Anlage (größere Mengen) getropft. Nach dem Abtropfen bildet sich ein wachsartiger Film auf der Tropfenoberfläche aus. Nachdem bei Raumtemperatur 83 % des Wassers verdunstet sind, werden die LentiKats® in Mineralsalzlösung (K_2HPO_4 100 mmol/L) zurückgequollen. Es entstehen linsenförmige Gelscheiben mit einem Durchmesser von etwa 3 mm und einer Dicke von 200-400 µm (Abb. 4-8). Die Anzucht der Zellen in den Immobilisaten erfolgte im Wachstumsmedium. Danach wurden die Immobilisate zur Produktion der Itaconsäure in ein Standard-Produktionsmedium überführt.

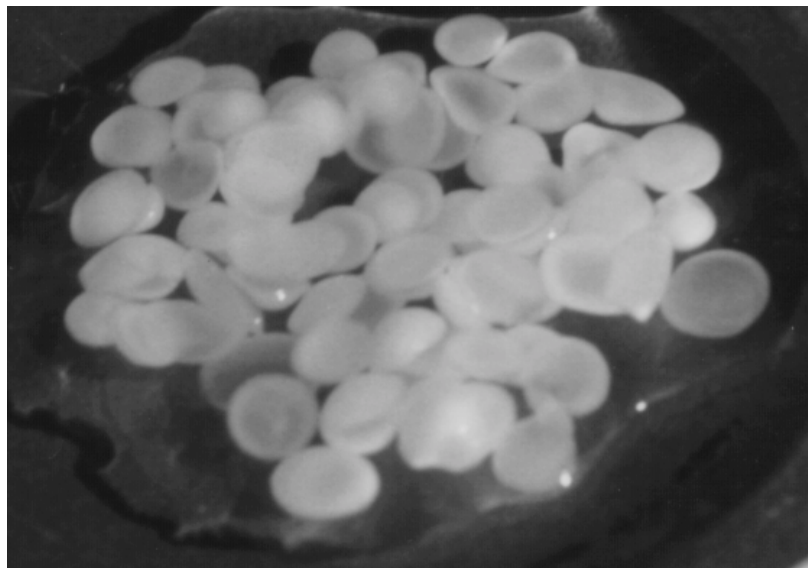


Abb. 4-8. LentiKats®

Wichtige Vorteile der LentiKats® sind neben einem Durchmesser von ca. 3 mm zur vereinfachten Rückhaltung der Immobilisate auch die geringe Dicke von 200 - 400 µm, die die Diffusionslimitierungen innerhalb der Gelmatrix herabsetzt [Jekel et. al. 1998]. Mit der Herstellung von LentiKats® steht ein Verfahren zur Verfügung mit dem bei Raumtemperatur elastische und reißfeste PVAL-Hydrogele ohne den Zusatz toxischer Vernetzer erhalten werden.

- **Herstellung der LentiKats® mit dem LentiPrint:**

Um unter definierten Bedingungen reproduzierbare kleine Mengen im Bereich von 1 bis 50 g herstellen zu können, wurde die LentiKats®-Herstellung mit dem LentiPrint durchgeführt.

Diese Apparatur wurde am Institut für Technologie [Wittlich, Jahnz 1998] entwickelt und gebaut. Das Prinzip der LentiPrint-Apparatur beruht darauf, dass ein Stahlstift kurzzeitig in eine Polymerlösung eingetaucht wird. Beim Herausnehmen bleibt Flüssigkeit haften, die sich als Tropfen am unteren Ende des Stiftes sammelt. Dieser Tropfen wird durch das Aufsetzen des Stahlstiftes auf eine glatte Oberfläche überführt, er zerläuft und geliert zu einem linsenförmigen Hydrogel. Der LentiPrint erlaubt durch eine große Anzahl parallel angeordneter Stifte die Herstellung von mehr als 400 LentiKats® bzw. ca. 1,5 g in einem Arbeitsgang. Anfangs- und Endpunkte dieses Geliervorganges sind deshalb gut kontrollierbar.

- **Automatische Herstellung der LentiKats® mit einer Technikumsanlage**

Zur Produktion größerer Mengen von LentiKats® wurde am Institut für Technologie eine halbtechnische Anlage konzipiert und gebaut, mit der pro Arbeitsgang, d.h. in etwa zwei Stunden, 250 g Katalysatoren hergestellt werden können [Jekel 1999].

Mit einer Auftropfvorrichtung wird die temperierte PVAL-Suspension gleichmäßig auf das Förderband getropft. Unmittelbar im Anschluss beginnt die Trocknungsstrecke. Die vortemperierte Trocknungsluft wird im Gegenstrom in den Trocknungskanal eingeleitet, so dass die Strömungsgeschwindigkeit aufgrund des Druckverlustes zu Beginn der Trocknungsstrecke geringer ist. Die Polymertropfen erreichen das Ende der Trocknungsstrecke nach 73 % Gewichtsverlust bzw. nach der Verdunstung von 87 % des Wassers und fallen nach dem Abstreifsystem direkt in die Rückquellvorrichtung.

4.4 Mikroskopische Untersuchungen der Immobilisate

Es wurden mikroskopische Untersuchungen zur Beobachtung des Wachstums der Mikroorganismen in den Immobilisaten der intakten Biokatalysatoren mit einer Stereolupe SV 8 (Zeiss, Oberkochen) und mit einem Lichtmikroskop Axioplan mit Fotoeinheit MC 100 (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Betrachtung von Immobilisaten mit dem Stereomikroskop erlaubt eine gute Übersicht über Dichte und Verteilung der Kolonien im Immobilisierungsmaterial. Bei geringer Vergrößerung können beispielsweise mehrere Immobilisate gleichzeitig betrachtet werden. Dies ermöglicht zum einen die Bewertung der Homogenität ein und derselben Immobilisatcharge und zum anderen den direkten Vergleich von Immobilisaten aus verschiedenen Ansätzen.

Zur Beobachtung der Biomasse in den Immobilisaten wurde eine 1:100 mit Wasser verdünnte Carbol-Fuchsin-Lösung der Fa. FLUKA verwendet. Der tiefrote Farbstoff färbt unspezifisch die Mikroorganismen an. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten in einem Überschuss der Färbelösung. Anschließend wurde kurz mit Leitungswasser gewaschen und die zellfreien Bereiche im Immobilisierungsmaterial für weitere 30 Minuten mit einem Überschuss an Leitungswasser entfärbt. Der Farbstoff lässt sich aus der zellfreien Matrix auswaschen.

4.5 Fermentersysteme zur Itaconsäureproduktion

4.5.1 Schüttelkolben

Schüttelkolbenversuche wurden durchgeführt, um verschiedene Immobilisierungsmaterialien, Substrate und Pilzstämme miteinander zu vergleichen sowie Spurenelemente und Mediumbestandteile zu testen. Die Tests erfolgten im 250-mL-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und Aluminium-Überfallkappe.

4.5.2 1,8-L-Rührkesselreaktor zur Fermentation freier Zellen

Die Batch- und kontinuierlichen Fermentationen mit freien Zellen des *Asp. terreus* NRRL 1963 wurden in einem ursprünglich für tierische Zellkulturen konstruierten Fermenter ausgeführt. Der Reaktor selbst besteht aus einem mit max. 1,8 L Nutzvolumen ausgestatteten Reaktionsraum aus Glas. Auf diesen war ein Deckel aus nichtrostendem Edelstahl aufgesetzt (Abb. 4-9, Abb. 4-10).

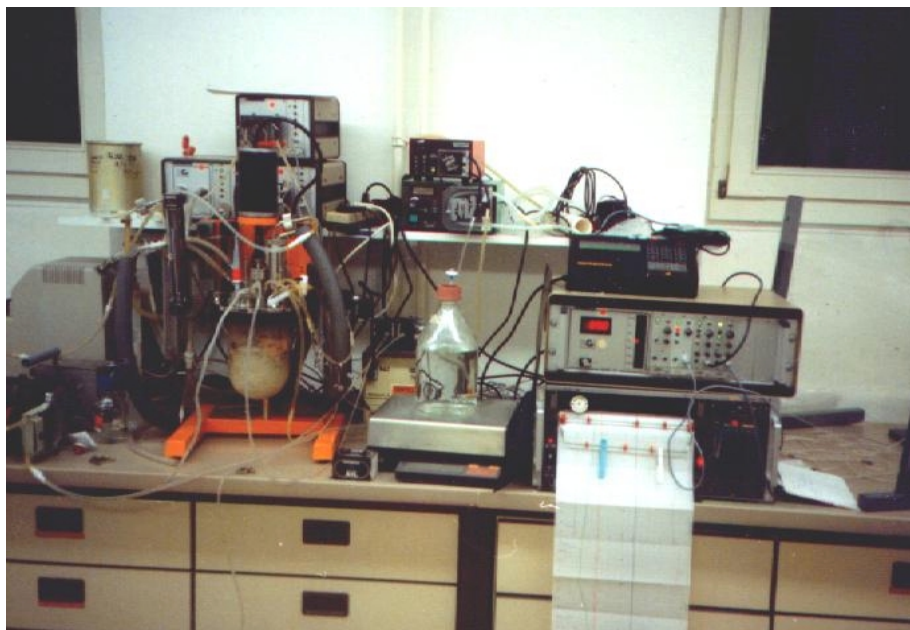
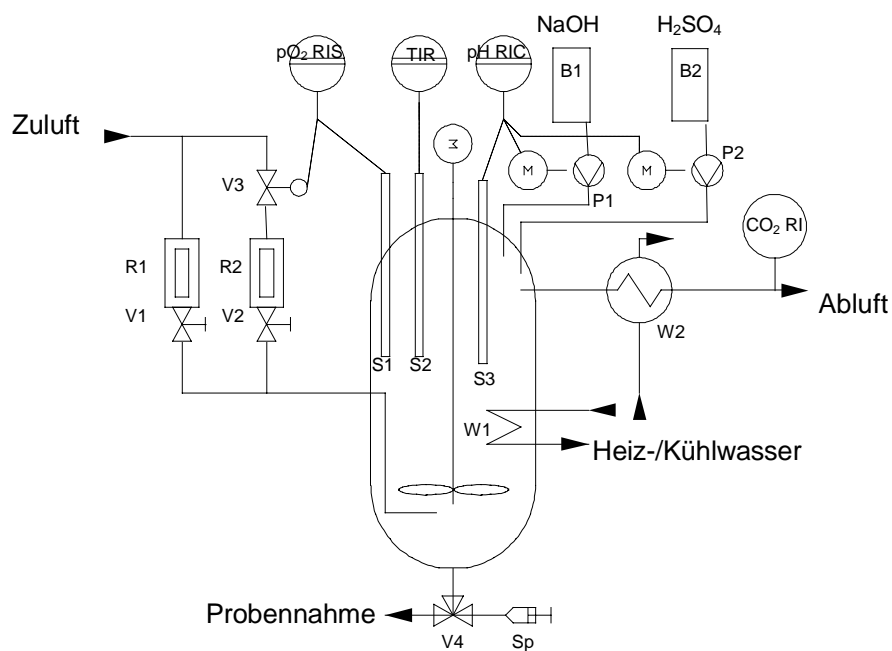


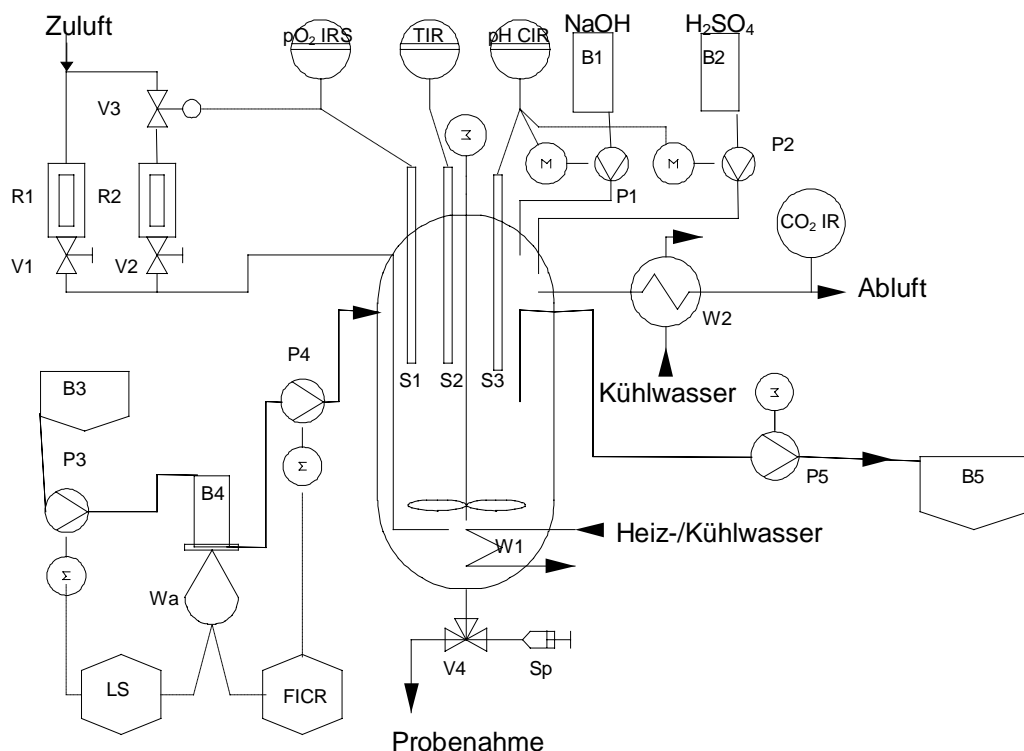
Abb. 4-9. 1,8-L Rührkesselformeter zur Fermentation von freien Zellen



B1	Vorratsgefäß für NaOH-Lösung	S2	Temperaturfühler
B2	Vorratsgefäß für Schwefelsäure	S3	pH-Elektrode
P1	Schlauchpumpe für NaOH-Lösung	Sp	sterile Spritze zum Ansaugen der Probe
P2	Schlauchpumpe für Schwefelsäure	V1	Einstellventil für Grundbegasung
R1	Rotameter für Grundbegasung	V2	Einstellventil für Zusatzbegasung
R2	Rotameter für Zusatzbegasung	V3	autom. Auf/Zu-Ventil für Zusatzbegasung
S1	amperometrische Sauerstoffelektrode	V4	3-Wegehahn für sterile Probenentnahme

Abb. 4-10. Schematische Darstellung 1,8 L-Rührkesselformenter

Um eine kontinuierliche Betriebsführung (Abb. 4-11) zu ermöglichen, war eine umfangreiche Erweiterung der Peripherieeinrichtungen erforderlich. Das Herz dieser Erweiterung bestand aus der mikroprozessorgeregelten Dosiereinrichtung YFC02Z von der Fa. Sartorius im Zusammenhang mit einer elektronischen Waage [Jandel 1991 und Memmert et al. 1987]. Auf der Waage stand eine 2 L fassende Schottflasche mit je einem Glasstutzen im unteren und oberen Flaschenbereich. Am unteren Stutzen war über einen Siliconschlauch eine peristaltisch arbeitende Schlauchpumpe angeschlossen, die frisches Medium in den Reaktor förderte. Die Drehzahl dieser Pumpe wurde dabei durch den Dosierregler bestimmt, der aus dem Vergleich von vorgegebenem Fluss-Sollwert mit den Daten der tatsächlichen Gewichtsabnahme von der Waage die optimale Pumpengeschwindigkeit errechnet und die Pumpe entsprechend ansteuerte.



B1	Vorratsgefäß für NaOH-Lösung	R1	Rotameter für Grundbegasung
B2	Vorratsgefäß für Schwefelsäure	R2	Rotameter für Zusatzbegasung
B3	10 L Vorratsgefäß für frisches Medium	S1	amperometrische Sauerstoffelektrode
B4	2 L Nachfüllgefäß für frisches Medium	S2	Temperaturfühler
B5	30 L Kanister zum Sammeln des Ablaufs	S3	pH-Elektrode
P1	Schlauchpumpe für NaOH-Lösung	Sp	sterile Spritze zum Ansaugen der Probe
P2	Schlauchpumpe für Schwefelsäure	V1	Einstellventil für Grundbegasung
P3	Schlauchpumpe zum Auffüllen des Nachfüllgefäßes	V2	Einstellventil für Zusatzbegasung
P4	Schlauchpumpe für die ständige Zudosierung von frischem Medium	V3	automatisch geregeltes Auf/Zu-Ventil für Zusatzbegasung
P5	Schlauchpumpe zum Abzug von Fermentationsbrühe	V4	3-Wegehahn für sterile Probenentnahme
		Wa	elektronische Waage
		W1	Heiz- bzw. Kühlschleife im Reaktor
		W2	Abluftkühler

Abb. 4-11. 1,8 L-Rührkesselfermenter für die kontinuierliche Betriebsweise mit freien Zellen

4.5.3 0,5-L-Rührreaktor zur Fermentation immobilisierter Zellen

Zum Test der Immobilisate wurde ein 0,5-L-Glasreaktor mit einem Magnetrührer verwendet (Abb. 4-12). Der Reaktor besitzt sieben Anschlüsse für Elektroden sowie Zu- und Ablauf und Probennahmestellen für Abluft, Medium und Biokatalysator.

Bei den Versuchen unter kontinuierlichen Bedingungen wurde das Gewicht des Auffanggefäßes zur Kontrolle der Flussrate mit einer Waage kontrolliert. Die verwendeten Schlauchpumpen für die Dosierung des Mediums und der Lauge wurden von der Firma Watson-Marlow (England) bezogen. Die Pumpenschläuche waren handelsübliche Siliconware.

Das gesamte System, d.h. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffversorgung und alle anderen Parameter und Funktionen wurden mit Soft- und Hardware kontrolliert und aufgenommen. Das System wurde komplett unsteril betrieben.



Abb. 4-12. Kontinuierliches Fermentersystem

4.6 Kultur- und Testmedien

4.6.1 Medium zur Stammhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme wurden von Stammsammlungen als Lyophilisate bezogen. Die Lyophilisate wurden auf Czapek-Dox-Agarplatten zwecks Stammhaltung bis zum optisch ausreichenden Bewuchs bei 30°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Alle 4-6 Monate erfolgte ein erneutes Überimpfen.

Tab. 4-4. Medium zur Stammhaltung

Mediumskomponente	Czapek-Dox-Agar
Glucose	30 g/L
Natriumnitrat	3 g/L
MgSO ₄	0,5 g/L
Kaliumchlorid	0,5 g/L
Eisen(II) sulfat	0,01g/L
di-Kaliumhydrogenphosphat	1 g/L
H ₂ O	Leitungswasser
pH-Wert	3,1; eingestellt mit 4M NaOH
Agar	13g

4.6.2 Wachstumsmedium zur Anzucht

Die Anzucht der Pilzkulturen fand in einem phosphathaltigen Wachstumsmedium nach Kautola (1990) im 250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen und Überfallkappe statt. Die Stammkulturen wurden dazu vom Schrägagar in das Wachstumsmedium überimpft und für 3-5 Tage bei 37°C und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 upm im Brutschrank im Dunkeln inkubiert. Die Glucoselösung und Mineralsalzlösung wurde getrennt 20 min bei 121°C und 1bar autoklaviert und danach zusammengefügt.

Tab. 4-5. Wachstumsmedium

Mediumskomponente	Wachstumsmedium
Glucose	60 g/L
NH ₄ NO ₃	4 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,95 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,004 g/L
KH ₂ PO ₄	0,08 g/L
H ₂ O	5 µS deion. Wasser
Anfangs-pH	3,1; eingestellt mit 4M NaOH

4.6.3 Minimal-Produktionsmedium zum Stammscreening

Für alle Produktionsmedien gilt, bevor die Biomasse zum Animpfen von Versuchsansätzen für die Itaconsäureproduktion eingesetzt wurde, wurde sie zuerst vom Wachstumsmedium getrennt und aufkonzentriert. Das Pilzmycel wurde anschließend in Produktionsmedium im Verhältnis 1:10 überführt. Die Glucoselösung und Mineralsalzlösung wurde getrennt 20 min bei 121°C und 1bar autoklaviert und danach zusammengefügt.

Tab 4-6. Minimal-Produktionsmedium für freie Zellen nach Kautola (1990)

Mediumskomponente	Minimal-Produktionsmedium
Glucose	60 g/L
NH ₄ NO ₃	4 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,004 g/L
KH ₂ PO ₄	-
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,3 g/L
H ₂ O	5 µS deion. Wasser
Anfangs-pH	3,1; eingestellt mit 4M NaOH

4.6.4 B&S-Produktionsmedium

Für Substratscreening- und Optimierungsversuche mit freien Zellen wurde ein Medium nach Batti & Schweiger verwendet. Die Eisenlösung wurde dem Medium sterilfiltriert zugegeben.

Tab 4-7. B&S-Produktionsmedium für freie Zellen nach Batty & Schweiger (1963)

Mediumskomponente	B&S-Produktionsmedium
Substrat	60-200 g/L
NH ₄ NH ₂ CO ₂ x NH ₄ HCO ₃	2,4 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/L
KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	9,91 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,0132 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0118 g/L
H ₂ O	5 µS deion. Wasser
Anfangs-pH	3,1; eingestellt mit 4M NaOH

Nach 20-24 h wurde je Liter Medium 12ppm Zn⁺⁺, 12ppm Cu⁺⁺ und 1,5ppm Fe³⁺ zusätzlich zugegeben.

4.6.5 Standard-Produktionsmedium

Nach einer Mediumoptimierung mit freien Zellen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in der hier vorliegenden Arbeit wurde für die Itaconsäureproduktion das Standard-Produktionsmedium (Tab.4-8) erarbeitet. Die Glucose- und Mineralsalzlösung wurden getrennt 20 min bei 121°C und 1bar autoklaviert und danach zusammengefügt.

Tab. 4-8. Standard-Produktionsmedium für freie und immobilisierte Zellen

Mediumskomponente	Standard-Produktionsmedium
Glucose	60-200 g/L
NH ₄ NO ₃	2 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,008 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,015 g/L
Fe ₂ (SO ₄) ₃ x 5H ₂ O	1,5 ppm
KH ₂ PO ₄	0,08 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 g/L
H ₂ O	5 µS deion. Wasser
Anfangs-pH	3,1; eingestellt mit 4M NaOH

Nach 20-24 h wurde je Liter Medium 12ppm Zn⁺⁺, 12ppm Cu⁺⁺ und 1,5ppm Fe³⁺ zusätzlich zugegeben.

4.6.6 Fermentationsmedium

Für eine kontinuierliche Fermentation wurde das Standard-Produktionsmedium an die Verhältnisse einer kontinuierlichen Fermentation angepasst (Tab. 4-9). Die Glucoselösung wurde autoklaviert. Die Mineralsalzlösung wurde der Glucoselösung unsteril zugefügt.

Tab. 4-9. Konti-Fermentationsmedium für immobilisierte Zellen

Mediumskomponente	Standard-Produktionsmedium
Glucose	60-100 g/L
NH ₄ NO ₃	2,5 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,8 g/L
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,003 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,004 g/L
KH ₂ PO ₄	0,001 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 g/L
H ₂ O	5 µS deion. Wasser
Anfangs-pH	3,1; eingestellt mit 4M NaOH

4.7 Verwendete Mikroorganismen

Die in der Tabelle 4-10 verwendeten *Aspergillus*-Arten wurden auf Ihre Fähigkeit zur Itaconsäurebildung hin untersucht.

Tab. 4-10. Verwendete Stammkulturen

Stamm	Bezeichnung	weitere mögliche Bezeichnung	Herkunft
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 1960	ATCC 10020	isoliert, 1943, Texas soil
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 1961		isoliert, 1943, soil, Chicago, IL
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 1963		isoliert, 1944, soil, Virginia
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 1969		isoliert, 1943, soil, Texas
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 680		
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826	ATCC 10020	
		NRRL 1960	
		IFO 6123	
		CBS 116.46	
		CMI 44243	
		IAM 2054	
		QM 6856	
<i>Aspergillus itaconicus</i>	NRRL 161		
<i>Aspergillus terreus</i>	NRRL 256	ATCC 10029	isoliert, 1934, Baltimore, MD

5. Itaconsäureproduktion mit freien Zellen

5.1 Einführung

Die wesentliche Entwicklung der Verfahren mit freier Pilzbiomasse fand bis 1966 statt. Danach verlor die wissenschaftliche Forschung vorübergehend für rund 15 Jahre das Interesse an der Weiterentwicklung. Erst Anfang der 80er Jahre erfolgte eine neue Phase der Erforschung von Fermentationsverfahren. In der Tabelle 5-1 sind die mit freiem Mycel in Batch-Betriebsweise aus den letzten 55 Jahren erzielten wichtigsten Ergebnisse zusammengestellt. In dieser Tabelle sind ebenfalls die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit freier Mycelmasse in Batch-Betriebsweise eingefügt worden.

Nur wenige Arbeiten referrieren kontinuierliche Fermentationen mit freiem Mycel (Tab. 5-2). Die geringe Anzahl der Berichte über kontinuierliche Fermentationen mit freien Zellen von *Aspergillus terreus* hängen mit dem Auftreten starken Rand- und Oberflächenwachstums des Pilzes zusammen [Rychtera & Wase 1981]. Park et al. (1994) berichten sogar von einem Zuwachsen der Begasungseinrichtung mit folgender unzureichender Sauerstoffversorgung ihres im Repeated-Batch betriebenen Reaktors. Alle anderen veröffentlichten kontinuierlichen Fermentationen arbeiteten mit immobilisierten Formen von *Aspergillus terreus*.

Die in den einzelnen Arbeiten referrierten Fermentationen unterscheiden sich zum Teil in ihren Bedingungen und vor allem in den Ergebnissen voneinander. Um sie trotzdem vergleichend gegenüberstellen zu können, wurden einige charakteristische Parameter, wie die Zusammensetzung des Mediums, Temperatur, pH-Wert, Endkonzentration an Itaconsäure, Bauart des Reaktors etc. herangezogen. Im Interesse einer möglichst guten Vergleichbarkeit wurden die in den Veröffentlichungen genannten Daten gegebenenfalls umgerechnet.

Da in den meisten vorliegenden Arbeiten entweder nur die eingesetzten Sporenkonzentrationen für das Wachstumsmedium oder aber nur die eingesetzten Biofeuchtmassen der Itaconsäurebildner für den Itaconsäureproduktionsprozess angegeben wurden, war ein Vergleich der verschiedenen Arbeiten in Bezug auf spezifische Aktivitäten nicht möglich.

Tab 5-1. Übersicht über veröffentlichte Batch-Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit freiem *A. terreus* Mycel

Autor	Stamm	Biomasse	VR [mL]	Reak- tortyp	T [°C]	pH	Produktionsmedium [g/L]	Ertrag [Mol%]	C _{Itac} [g/L]	Prod. [g/(Lxh)]	Dau- er [d]
Lockwood&Reeves 1945	NRRL1960	mit einer "guten" Menge Sporen angeimpft	60	OFK in Kolben	30	2,1	Glc:250 NH ₄ NO ₃ :2,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O:4,5 NaCl:0,4 ZnSO ₄ ·7H ₂ O:0,0044 HNO ₃ :1,6 CSL:4	51	68	0,24	12
Moyer&Coghill 1945	NRRL265	mit unausge- keimten Sporen angeimpft	50	OFK in Kolben	35/ 30	2,1	Glc:250 NH ₄ NO ₃ :2 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,25 KCl:0,05 ZnSO ₄ ·7H ₂ O:0,044 CSL:4	42,9	50	0,17	12
Lockwood&Nelson 1946	NRRL1960	mit 2 Pellets Ø 2mm angeimpft	125	SK	30	1,8	Glc:60 NH ₄ NO ₃ :2,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,75 CSL:1,5 Fe-Tartrat:0,25	47,3	20	0,09	9
Nelson et al. 1952	NRRL1960	0,8% BFM	15 000	STR	34	1,9	Glc:60 (NH ₄) ₂ SO ₄ :2,67 MgSO ₄ ·7H ₂ O:5 CSL:1,5 Fe ²⁺ :0-20mg	70	31	0,23	5,6
Larsen&Eimhjellen 1955	NRRL1960	50 mL BFM= 50% BFM	100	SK	30	5,5	Glc:45 (NH ₄) ₂ SO ₄ :3 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,5 KH ₂ PO ₄ :0,1 CaSO ₄ :3	64,8	23,2	0,19	5
Nubel&Ratajak 1962	NRRL1960	400 mL BFM= 20% BFM	2000	STR	40	3,8	Rohrmelasse Sac:150 ZnSO ₄ :1 MgSO ₄ ·7H ₂ O:5 CuSO ₄ ·5H ₂ O:0,02 Sjaöl:0,25	k.A.	70,8	0,98	3
Batti&Schweiger 1963	NRRL1960	400 mL BFM= 20% BFM	2000	STR	34	3,0	Rohrzuckerdicksaft Sac:130 NH ₄ NH ₂ CO ₂ : NH ₄ HCO ₃ :2 Zn ²⁺ :0,003 CaCl ₂ ·2H ₂ O:12 MgSO ₄ ·7H ₂ O:1 KH ₂ HPO ₄ :0,14 Cu ²⁺ :0,003	89,6	75	0,41	7,7
Rychtera&Wase 1981	NRRL1960	7% BFM	100	STR	36	3,1	Glc:50 (NH ₄) ₂ SO ₄ :3,3 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,8 KH ₂ PO ₄ :0,088 CuSO ₄ ·5H ₂ O:0,004 IA:1	k.A.	40	0,33	5
Okabe et al. 1993	IFO6365	200 mL BFM mit 8 g/L BTM	2000	ALR StN	40	2	Glc:130 NH ₄ NO ₃ :5 MgSO ₄ ·7H ₂ O:2 CSL:1,8	73,4	63	0,66	4
Tzekova&Vicheva 1993	19-78	10% BFM	100	SK	36	2,3	Glc:125 NH ₄ NO ₃ :1,5 MgSO ₄ ·7H ₂ O:3 CSL:5	78,2	70	0,41	7,1
Rhone-Poulenc 1994	NRRL1960	5 x 10 ⁷ Sporen/mL	500	SK	34	2,9	Sac:110 NH ₄ NO ₃ :1,2 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,3KH ₂ PO ₄ :0,05Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O :0,38Ca(OH) ₂ :0,315CSL:0,5MgO:0,3	83,8	69,7	0,44	6,7
Gyamerah 1995a	NRRL1960	5 mL= 5%BFM	100	SK	30	k.A	Sac:100 (NH ₄) ₂ SO ₄ :3 MgSO ₄ :0,5 KH ₂ PO ₄ :0,1 Gips:3	k.A.	55	0,29	8
Yahiro et al. 1997	TN-484	200 mL BFM = 10% BFM	2000	ALR	40	2	Corn Starch 140, NH ₄ NO ₃ :2,9 MgSO ₄ ·7H ₂ O:1,8 CSL:1,2; Stärke wurde eingangs mit Enzymen hydrolysiert	61	58	0,402	6
Welter 1999	NRRL 1963	10 % BFM mit 2,1 g/L BTM	100	Batch SK	37	3,1	Glucose 80, NH ₄ NO ₃ :2 MgSO ₄ ·7H ₂ O:1, Cu- SO ₄ ·5H ₂ O 0,015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O: 0,008, KH ₂ PO ₄ : 0,08, CaCl ₂ ·2H ₂ O:10, Fe(III)SO ₄ x 5 H ₂ O: 1,5 ppm	86,15	49	0,4	8

Tab 5-2. Übersicht über veröffentlichte kontinuierliche und Repeated Batch Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit *freima. terreus Mycel*

Autor	Stamm	Biomasse	VR [L]	Reaktortyp	T [°C]	pH	Produktionsmedium [g/L]	Ertrag [Mol%]	C _{Itac} [g/L]	Prod. [g/(L·h)]	Dauer [d]
Kobayashi & Nakamura 1966	K26	0,5% BTM mit 5 g/L BTM	20	STR WH	38	k.A.	Glc:120 NH ₄ NO ₃ :3 MgSO ₄ ·7H ₂ O:2 CSL:2 HNO ₃ :0,5	12,5	15	0,48	k.A.
Konti-Betrieb v. Fries 1966	NRRL1960	angeimpft mit 10 ³ -10 ⁴ Sporen/mL	300	STR	34	3,2	Rübenmelasse: Sac:37 MgSO ₄ :0,071 (NH ₄) ₂ HPO ₄ :0,029 Fe(CN) ₆ ⁴⁻ :0,028, nach 2d ZnSO ₄ :0,023	65,2	86,9	0,66	5,5
Fed-batch-Betrieb Rychtera & Wase 1981	NRRL1960	7% BFM	300	STR	36	3,1	Glc:50 (NH ₄) ₂ SO ₄ :3,3 MgSO ₄ ·7H ₂ O:0,8 ITA:1,0 KH ₂ PO ₄ :0,088 CuSO ₄ :0,004	15,6	7,8	0,32	37
Konti-Betrieb Welter 1999	NRRL 1963	10 % BFM mit 2,1 g/L BTM	0,1	SK	37	3,1	Glucose 80, NH ₄ NO ₃ :2 MgSO ₄ ·7H ₂ O:1, CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,015, ZnSO ₄ ·7H ₂ O: 0,008, KH ₂ PO ₄ : 0,08, CaCl ₂ ·2H ₂ O:10, Fe(III)SO ₄ x 5 H ₂ O: 1,5 ppm	40	30	0,3	27
Repeated-Batch-Betrieb											

Erläuterungen zu den Spalten der Tabellen 5-1 und 5-2:

Reaktortyp	STR	Rührkesselreaktor
	OFK	Oberflächenkultur
	SK	Schüttelkolben
	ALR	Air-Lift-Reaktor
	ALR StN	Airliftreaktor mit Stahlnetzen im Leitrohr
	Glc	Glucose
	Sac	Saccharose
	CSL	Maisquellwasser, corn-steep-liquor
	k.A.	keine Angaben

5.2 Stammscreening

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Auswahl geeigneter Pilzstämmen, welches die Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Etablierung eines biotechnologischen Verfahrens zur industriellen Herstellung von Itaconsäure darstellt.

Die Anfang der 40er Jahre am Northern Regional Research Laboratory (NRRL) im US-Bundesstaat Illinois durchgeführten umfangreichen Arbeiten in der Arbeitsgruppe um Lockwood bilden die Grundlage auch der heutigen industriellen Anwendung der mikrobiologischen Itaconsäureherstellung. Am NRRL wurde ein Screening mit 308 Stämmen von *Aspergillus terreus* durchgeführt, von denen jedoch nur elf eine Itaconsäurebildung mit einem Ertrag von mindestens 45 % (mol/mol) aufwiesen. Dazu gehört u.a. der besonders leistungsfähige Stamm NRRL 1960. Dieser war lange Zeit der meist eingesetzte und erforschte Stamm [Lockwood & Reeves 1945]. Der Stamm NRRL 265 kam nur in Oberflächenkultur in der Arbeit von Moyer & Coghill (1945) zur Anwendung und hatte später keine Bedeutung mehr. Bei den älteren Arbeiten wurde vorwiegend der Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1960 eingesetzt (Synonyme ATCC 10020, IFO 6123, TKK200-5-1 und DSM 826), während die jüngeren Arbeiten besonders den aus Japan am Institute of Fermentation in Osaka 1958 isolierten Stamm IFO 6365 und den durch Chemomutation von ihm abgeleiteten Hochleistungsstamm TN-484 benutzten [Yahiro et al. 1995]. Während vom Stamm K 26 (Synonym ATCC 32359) bekannt ist, dass er vom Stamm ATCC 10020 abgeleitet wurde, liegen zur Herkunft der Stämme 19-78, G026 sowie TKK200-5-2 und TKK200-5-3 keine Informationen vor.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde auf die Untersuchungen des Northern Regional Research Laboratory (NRRL) zurückgegriffen. Es wurde ein Stammscreening mit den laut der NRRL sieben stärksten (siehe Tab. 4-9) der möglichen Itaconsäurebildner auf verschiedenen C-Quellen (Glucose, Saccharose, Stärke, Rapsöl, Glycerin, Melasse und Sauermilchmolke) durchgeführt. Zur Auswahl geeigneter Pilzstämmen wurden jeweils 10g BFM der verfügbaren 7 Stämme in 90 mL Minimal-Produktionsmedium mit einer jeweiligen Substrat-Anfangskonzentration von 60 g/L im Dunkeln bebrütet. Die Inkubation erfolgte in 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen bei 37°C, einem Anfangs-pH-Wert von 3,1 und einer Rotationsschüttlerfrequenz von 120 Upm. Unter diesen definierten Versuchsbedingungen wurden die Stämme in einem zweistufigen Batch-Ansatz auf Ihre Fähigkeit zur Itaconsäureproduktion untersucht. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden alle Versuche in einem Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt.

- Erste Stufe: Förderung des Pilzwachstums in einem Wachstumsmedium (siehe Tab. 4-5)
- Zweite Stufe: Produktion der Itaconsäure in einem Minimal-Produktionsmedium (siehe Tab. 4-6)

Innerhalb von 7 Tagen erreichten die Pilzstämme *Aspergillus terreus* NRRL 1963, 1960, 1961 und 1969 sowohl auf **Glucose**, als auch auf **Saccharose** Itaconsäurekonzentrationen von 6-8 g/L. Mit den Pilzstämmen *Aspergillus terreus* NRRL 161, 680 und 256 konnten nur die Hälfte oder weniger als die Hälfte dieser Itaconsäurekonzentrationen erreicht werden. Die kürzeste lag-Phase, sowie höchste Aktivität mit der C-Quelle Glucose(Abb. 5-1), als auch mit der C-Quelle Sachharose (Abb. 5-2) erreichte *Aspergillus terreus* NRRL 1963.

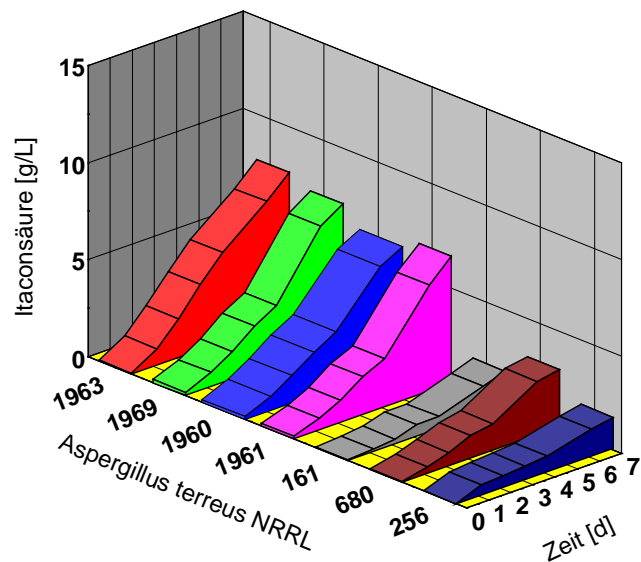


Abb. 5-1. Stammscreening mit Glucose als C-Quelle

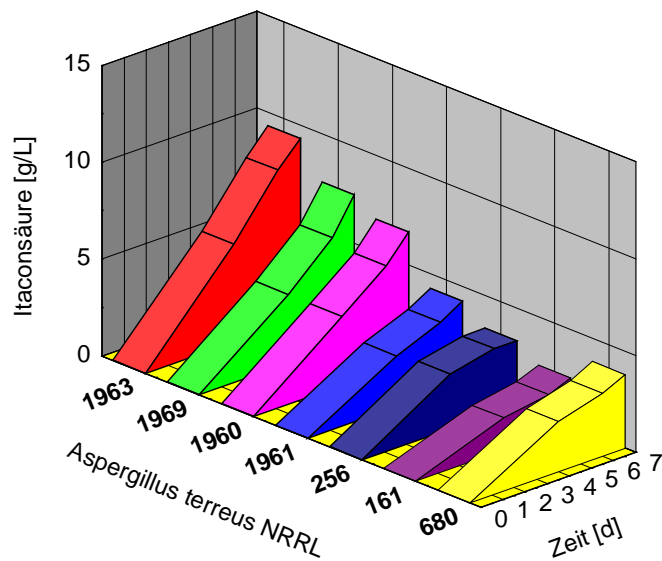


Abb. 5-2. Stammscreening mit Saccharose als C-Quelle

Zur Auswahl geeigneter Pilzstämme wurden die 7 verfügbaren Itaconsäurebildner auch auf den C-Quellen **unhydrolysierter Stärke (Mais und Triticale nativ)** und **teilhydrolysierter Stärke** (teilhydrolysiert bis zu einem mittleren Molekulargewicht) inkubiert. Bei unhydrolysierte Stärke als C-Quelle konnte keine Itaconsäureproduktion festgestellt werden. Bei teilhydrolysierten Stärke konnten mit den Pilzstämmen *Aspergillus terreus* NRRL 1963 und *Aspergillus terreus* NRRL 1969 Itaconsäurekonzentrationen von 5 g/L in 7 Tagen erreicht werden. Auch beim Stammscreening mit **Glycerin** als C-Quelle fiel wieder der Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 durch eine hohe Aktivität auf (Abb. 5-3).

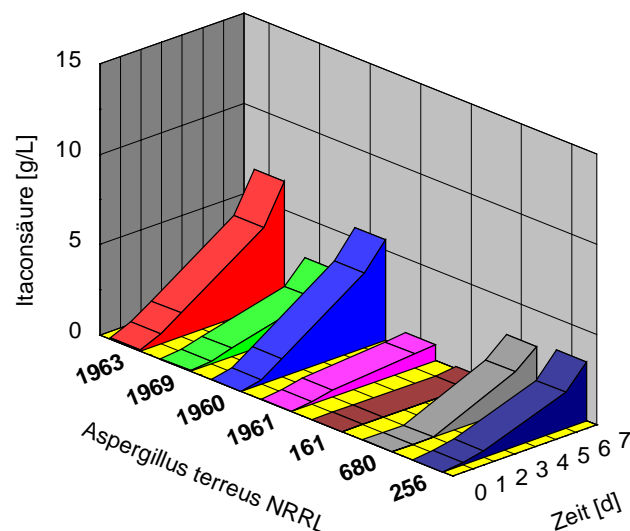


Abb. 5-3. Stammscreening mit Glycerin als C-Quelle

Die C-Quellen **Rapsöl**, **Melasse** und **Sauermilchmolke** konnten nicht für das Stammscreening verwendet werden. Auf diesen Substraten erfolgte keine oder nur eine geringe Itaconsäureproduktion.

Bisher bekannte Ergebnisse beziehen sich hauptsächlich auf den Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1960. Im durchgeführten Stammscreening konnten mit dem Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 für verschiedene C-Quellen höhere Ausbeuten als mit dem Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1960 erzielt werden. Als Itaconsäureproduktionsstamm in der hier vorliegenden Arbeit wurde in allen folgenden Arbeiten der Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 verwendet.

5.3. Substratscreening

Um eine Kostenreduzierung bei der Itaconsäureproduktion zu erreichen, wurde u.a. ein Screening geeigneter Rohstoffquellen der Landwirtschaft als Substrate für die Itaconsäureproduktion durchgeführt. Die Auswahl einer geeigneten C-Quelle für die Itaconsäureproduktion hängt im wesentlichen von wirtschaftlichen Gesichtspunkten wie Kosten und Verfügbarkeit und der erreichbaren Ausbeute an Itaconsäure ab. Erste Untersuchungen über geeignete C-Quellen für Wachstum und Produktion von *Aspergillus terreus* NRRL 1960 machten bereits 1955 Larsen, H. & Eimjhellen, K. (Tab.5-3).

Tab. 5-3. Wachstum und Itaconsäurebildung auf Zucker und Alkoholen mit *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in Schüttelkolbenkultur [Larsen, H. & Eimjhellen, K., 1955]

Substrat	Wachstum	gebildete Itaconsäure in % (w/w) des konsumierten Substrates
Inulin	+++	12
Stärke nativ	+++	0
Glycogen	+++	0
Raffinose	+++	0
Cellobiose	+++	41
Maltose	+++	0
Saccharose	+++	57
D-Glucose	+++	52
D-Mannose	+++	32
D-Galactose	++	4
D-Fructose	+++	26
L-Rhamnose	+++	0
L-Arabiose	+++	18
D-Xylose	+++	31
Ethanol	+++	11
Glycerin	+++	23

In den vergangenen Jahren dienten als C-Quelle zur Itaconsäureproduktion meist Glucose und Saccharose. Der Einsatz der Pentose Xylose in kontinuierlichen und Repeated-Batch-Versuchen erbringt im Vergleich mit Hexosen nur geringe Produktivitäten [Kautola et al. 1985, Kautola 1990]. Neben den Zuckern im engeren Sinn, wird der Einsatz von Glycerin und vorbehandelter Stärke als C-Quelle in der Literatur beschrieben [Rhône-Poulenc 1989,

Rhone-Poulenc 1994, Petruccioli et al 1999]. Eine Fermentation mit Glycerin erbringt jedoch nur dann gegenüber dem ausschließlichen Einsatz von Zuckern vergleichbare Ausbeuten, wenn es zusammen mit einem Zucker verabreicht wird (z.B. 25 Gew. % Glycerin + 75 Gew. % Saccharose). Außerdem wird die Fermentationsdauer bei Anwesenheit von Glycerin als zusätzlicher C-Quelle um ca. 50 % verzögert [Rhone-Poulenc 1994].

Unter Berücksichtigung bekannter Ergebnisse von Substrat-Screeningversuchen für die Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1960 wurden mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ebenfalls Screeningversuche mit Substraten auf der Basis nachwachsender Rohstoffe und mit Reststoffen der Landwirtschaft durchgeführt. Alle Screeningversuche wurden mit 100 mL B&S-Produktionsmedium (s. Tab. 4-7) in kleinen Testansätzen (250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen) durchgeführt. Das Pilzmycel wurde im Verhältnis 1:10 angeimpft. Zur Vergleichbarkeit der Substrate untereinander wurden alle Versuche mit 100 g/L Substrat-Anfangskonzentration durchgeführt und nach 5 Tagen abgebrochen. Die Substrate, die in diesen 5 Tagen eine gute Itaconsäurebildung lieferten, wurden in anschließenden Versuchen länger inkubiert und die weitere Itaconsäurebildung bzw. der weitere Substratabbau verfolgt.

5.3.1 Substratscreening mit Kohlenstoffquellen auf der Basis nachwachsender Rohstoffe

5.3.1.1 Stärke und deren Abbauprodukte

Im Patent nach P. Cros und D. Schneider (1989) wurde ein Fermentationsverfahren vorgestellt, bei dem Stärke als C-Quelle eingesetzt wurde. In dieser Arbeit wurde berichtet, dass man Itaconsäure mit Mikroorganismen herstellen kann, die Stärke enzymatisch hydrolysieren können. Der Ertrag pro Zeit erreichte aber nie einen mit Glucose als C-Quelle erreichbaren Wert. In der Arbeit nach Rhone-Poulenc (1989) wurde berichtet, dass bei der Verwendung von Stärke vor oder während der Fermentation je nach Polymerisierungsgrad ein oder mehrere amylolytische Enzyme zugegeben werden müssen, um die Stärke als C-Quelle in Form von Oligosacchariden dem Pilz zugänglich zu machen. Läuft die Amylolyse erfolgreich ab, sind dem direkten Einsatz von Zuckern vergleichbare Ausbeuten mit ähnlichen Produktivitäten erzielbar. Petruccioli et al (1999) führten Versuche mit verschiedenen vorbehandelten Stärken durch. Die erreichten Itaconsäureproduktionen in dieser Arbeit waren jedoch verhältnismäßig niedrig.

Aufgrund der Literaturangaben wurden in der hier vorliegenden Arbeit zuerst Stärke nativ, dann Glucosesirup verschiedener Verzuckerung und zum Schluss die reine Glucose als mögliche C-Quellen für die Itaconsäureproduktion getestet. Beim Test der Stärke nativ als C-Quelle für die Itaconsäureproduktion wurde festgestellt, dass *Aspergillus terreus* NRRL 1963 nicht in der Lage ist, **Kartoffel- oder Triticalestärke** für die Itaconsäureproduktion zu

verwerten bzw. D-Glucose durch enzymatische Hydrolyse aus der nativen Kartoffel- oder Triticalestärke als C-Quelle für die Itaconsäureproduktion zu gewinnen.

Als zweites wurde **teilhydrolysierten Stärke** der Fa. Merck (Nr. 1252) als C-Quelle für die Itaconsäureproduktion getestet. Mit dieser teilhydrolysierten Stärke konnten mit 100 g/L Stärke in 5 Tagen 16,3 g/L Itaconsäure produziert werden. Die eingesetzte vorbehandelte Stärke der Fa. Merck war bereits durch saure Hydrolyse bis zu einem mittleren Molekulargewicht (genaue Angaben vom Hersteller lagen nicht vor) abgebaut. Im Anschluss an diesen Versuch stellte sich die Frage, bis zu welchem Grad die Stärke vorbehandelt sein muss, damit der Pilz *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in der Lage ist, diese C-Quelle zur Itaconsäureproduktion zu nutzen. Zur Aufklärung dieses Sachverhalts wurden Versuche mit unterschiedlichen Qualitäten von Glucosesirup (enzymatisch oder durch Säurehydrolyse verzuckerte Stärke) durchgeführt. Hierzu wurden 4 unterschiedliche Qualitäten von **Glucosesirup aus Stärke** als C-Quelle für die Itaconsäureproduktion getestet. Die Unterschiede der Qualitäten lagen im Grad der Verzuckerung. Der eingesetzte Glucosesirup stammte von der Firma Cerestar Deutschland GmbH (Krefeld).

Es wurden getestet:

- Glucosesirup Cerestar Sweet D 02665 99,5 % Dextrose, DE 99,5-100 %
- Glucosesirup Cerestar Plus 1535 1,5-3 % Dextrose, DE 42-46 %
- Glucosesirup Cerestar Sweet 01127 15-19 % Dextrose, DE 37,5-40,5%
- Glucosesirup Cerestar Plus 15051 60-80 % Dextrose

Aus den Abbildungen 5-4 a und b geht deutlich hervor, welche Anfangskonzentrationen an verfügbarer Glucose bei den Produkten hoher und niedriger Verzuckerung für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 vorlagen. Beim Glucosesirup hoher Verzuckerung (Cerestar Sweet 02665, 99,5% Dextrose) lag der Glucosesirup zu fast 70 % als reine Glucose vor.

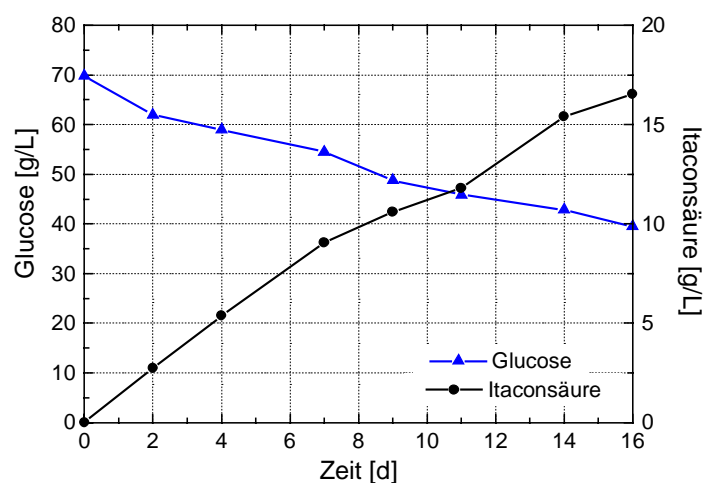


Abb. 5-4a. Itaconsäurebildung und Abbau von Glucosesirup hoher Verzuckerung (Cerestar Sweet D 02665)

Im Glucosesirup niederer Verzuckerung (Cerestar Sweet 01127, 53-62 % Dextrose) lagen von 100 g/L eingesetztem Glucosesirup nur ca. 15 g/L als reine Glucose vor.

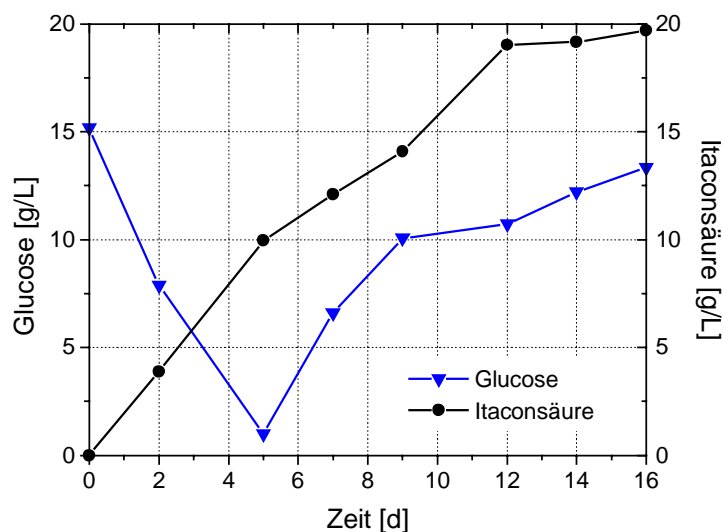


Abb. 5-4b. Itaconsäurebildung und Abbau von Glucosesirup niederer Verzuckerung (Cerestar Sweet 01127)

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Animpfmenge:	10 % BFM
	Substrat:	5-4a) 100 g/L Glucosesirup Cerestar Sweet D 02665 (99,5%, Dextrose, DE 99,5-100 %)
		5-4b) 100 g/L Glucosesirup Cerestar Sweet 01127 (15-19% Dextrose, DE 37,5-40,5 %)
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Nach 5 Tagen Inkubation des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 mit diesen C-Quellen wurden mit 100 g/L Cerestar Sweet 02665 (99,5% Dextrose, 99,5 % DE) ca. 7 g/L Itaconsäure, mit 100 g/L Glucosesirup Cerestar Sweet 01127 (15-19% Dextrose, 37,5-40,5% DP) ca. 10 g/L Itaconsäure gebildet.

Interessant war bei Verwendung von Glucosesirup niederer Verzuckerung (Cerestar Sweet 01127, 53-62 % Dextrose) die Beobachtung, das *Aspergillus terreus* NRRL 1963 zuerst die vorliegende verwertbare Glucose abbaut und zu Itaconsäure verwertet (Abb.5-4b; 0-5d). Nach Verbrauch der vorliegenden Glucose stieg jedoch die Glucosekonzentration erneut an. Es wurde auch weiterhin Itaconsäure gebildet. Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, das *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in diesem Versuch verschieden große Bruchstücke der Stärke zu Glucose abgebaut und diese dann zu Itaconsäure weiterverwertet hat.

Aspergillus terreus NRRL 1963 ist demnach bei eingangs im Medium vorhandener Glucose in der Lage Enzyme zu bilden, die Glucose durch enzymatische Hydrolyse aus Stärke gewinnen. Bei Verwendung von Stärke als C-Quelle kann so auf Zugabe von amylolytischen

Enzymen, welche die Stärke als C-Quelle in Form von Oligosacchariden dem Pilz zugänglich machen, verzichtet werden. Diese interessante Beobachtung sollte in künftigen Arbeiten eingehender untersucht und evtl. für eine industrielle Produktion optimiert werden.

Die industrielle Gewinnung reiner **Glucose** erfolgt durch saure oder enzymatische Hydrolyse von Kartoffel- oder Maisstärke. Glucose der Fa. Merck (Darmstadt) wurde auf seine Eignung als C-Quelle zur Itaconsäureproduktion getestet. Mit 100 g/L Glucose wurden nach 5 Tagen 23,2 g/L Itaconsäure gebildet.

5.3.1.2 Saccharose

Saccharose ist ein nichtreduzierendes Disaccharid aus D-Fructose und D-Glucose. Saccharose der Fa. Merck (Darmstadt) wurde auf seine Eignung als C-Quelle zur Itaconsäureproduktion getestet. Nach 5 Tagen Inkubation von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 mit 100 g/L Saccharose-Anfangskonzentration wurden 19,2 g/L Itaconsäure gebildet.

In den ersten 10 Tagen erfolgte ein rascher Glucoseabbau und eine hohe Itaconsäureproduktion (nach 10d ca. 50 g/L Itaconsäure). Obwohl nach diesen 10d noch Glucose und vor allem genügend Fructose im Medium vorhanden waren, erfolgte so gut wie keine weitere Itaconsäureproduktion mehr (nach 14d ca. 58 g/L Itaconsäure). Um die Frage zu klären, ob der Pilz eventuell keine Fructose abbauen kann, wurde in einem weiteren Versuch nur **Fructose** als C-Quelle angeboten. Im Ergebnis dieses Versuches zeigte sich, *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ist in der Lage Fructose zu Itaconsäure abzubauen (nach 5 d wurde mit 100 g/L Fructose-Anfangskonzentration 14,5 g/L Itaconsäure gebildet). Das Nachlassen der Itaconsäureproduktion nach ca. 10 Tagen Inkubation ist nicht in der Nichtverwertung der vorliegenden Fructose begründet, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer Produkt hemmung durch die Itaconsäure selbst (nach 10d Inkubation 50 g/L Itaconsäure, s. Kap. 5.4.8). *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ist in der Lage Fructose abzubauen, verwertet aber bevorzugt Glucose.

5.3.1.3 Inulin

Da auch Inulin eine mögliche C-Quelle zur Itaconsäurefermentation darstellen kann, wurde Inulin auf seine Fähigkeit, als Substrat für die Itaconsäureproduktion zu dienen, getestet. Inulin ist aus β -1,2- verknüpften D-Fructosemolekülen aufgebaut und besitzt stärkeähnliche Eigenschaften. Der Polymerisationsgrad des Inulins ist geringer als bei Stärke. Inulinspeichernde Pflanzenarten (Topinambur und Zichorie) werden in Europa schon seit langer Zeit

angebaut. In Frankreich, den Niederlanden und Belgien wird Inulin bereits in fructosehaltigen Inulinsirupen im großtechnischen Maßstab gewonnen. Ein Nachteil des Inulins ist jedoch bisher der hohe Preis.

Inulin der Fa. Fluka erwies sich als eine mögliche C-Quelle zur Itaconsäureproduktion (nach 5 Tagen wurden mit 100 g/L Inulin ca. 2,7 g/L Itaconsäure gebildet). Aufgrund des hohen Preises von Inulin kommt diese C-Quelle für eine mögliche Itaconsäurefermentation jedoch nicht in Frage.

5.3.1.4 Rapsöl

In Deutschland werden jährlich ca. 40.000 t Rapsöl produziert. Rapsöl ist damit nach der Stärke der mengenmäßig wichtigste nachwachsende Rohstoff in der landwirtschaftlichen Produktion. Die ungesättigten Fettsäuren müssen zuerst vom Mikroorganismus durch Lipasen gespalten werden. Rapsöl der Dt. Cargill wurde in einer Wasser-in-Öl-Emulsion verwendet.

Rapsöl (unbehandelt) erwies sich als ungeeignete C-Quelle. Es konnten nur minimale Mengen an gebildeter Itaconsäure nachgewiesen werden (nach 5 d wurde bei 100 g/L Rapsöl-Anfangskonzentration 0,04 g/L Itaconsäure gebildet). Die verwendete Emulsion entmischte sich schnell, so dass das Öl für den Pilz schlecht verfügbar war. Rapsöl könnte durch Zugabe von Emulgatoren in eine wasserlösliche Form gebracht und so dem Pilz als C-Quelle angeboten werden. Dies erhöht jedoch die Kosten und verfälscht das Ergebnis der Itaconsäureausbeute, da wahrscheinlich die Emulgatoren vom Pilz als C-Quelle verwertet werden.

5.3.1.5 Glycerin

Im Zuge der zunehmenden Nutzung nachwachsender Rohstoffe fallen bei der Herstellung von Rapsöl-Methylester als Koppelprodukt beträchtliche Mengen Glycerin an. Eine Möglichkeit, Glycerin in ein höherwertiges Produkt umzuwandeln, stellt die Umsetzung in Itaconsäure dar. Glycerin der Ölmühle Leer (Rohglycerin) wurde zuerst autoklaviert und dann dem Standard-Produktionsmedium zugesetzt. Nach 5 d wurde eine Itaconsäurekonzentration von 6,58 g/L mit 100 g/L Glycerin erreicht. Rohglycerin enthält neben Wasser zusätzlich noch anorganische Salze. Der höhere Salzgehalt des Mineralsalzmediums kann ein Grund dafür sein, dass bei Einsatz von Rohglycerin, das etwa 10 % Salze enthält, die Umsetzung von Glycerin zu Itaconsäure beeinträchtigt wurde und eine Adaption des Pilzes erforderlich war. Im Kapitel 5.4.2 wird näher auf die Empfindlichkeit des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in Bezug auf Makro- und Spurenelemente eingegangen.

5.3.2 Itaconsäurebildung auf Reststoffen der Landwirtschaft

5.3.2.1 Melasse

Alle löslichen Rübeninhaltsstoffe, ausgenommen kristallisierbarer Zucker, sind sogenannte Melassenbildner. Die Melasse ist ein preiswertes Substrat, da sie als Nebenprodukt bei der Weißzuckerherstellung aus Zuckerrüben anfällt. Der Vorteil von Melasse liegt im hohen Zuckergehalt von etwa 50 % Saccharose. Den Rest bilden 30 % Nichtzuckeranteile und 20 % Wasser.

Melasse der Nordzucker AG wurde ohne Aufarbeitung - als Abfallprodukt der Zuckerrübe - eingesetzt. Versuche in kleinen Testansätzen zeigten, dass sich die verwendete Melasse nicht als C-Quelle für die Itaconsäureproduktion eignet. Es konnten nur minimale Mengen an gebildeter Itaconsäure produziert werden (nach 5 d wurden mit 100 g/L Melasse-Anfangskonzentration 0,05 g/L Itaconsäure gebildet). Während der Versuchszeit bildeten sich kleine kompakte Mycel-Pellets, welche sich auf dem Boden absetzten.

Bei Melasse als C-Quelle muss immer beachtet werden, dass dieses Substrat je nach Produktionscharge eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen kann. Als Hemmstoffe können in der Melasse Nitrit, Sulfit, niedere flüchtige Fettsäuren, Schwermetalle und Phosphat auftreten [Auslegungsschrift der BRD 1 219 430, 1966]. Melasse besitzt einen hohen Anteil an Stickstoffverbindungen, welche hemmend auf die Itaconsäureproduktion wirken können.

So bewirkt Nitrat die Induzierung der Cytochrom-Oxidase, welche die Oxidation von Glucose zu Wasser steuert. Das Ausbleiben der Itaconsäureproduktion durch *Aspergillus terreus* deutet daraufhin, dass hier hemmende Faktoren der Zuckerrübenmelasse eine Rolle spielen.

Bei dem Versuch, die verhältnismäßig teuren reinen Zucker durch billigere Melassen oder Hydrolysate zu ersetzen, scheiterten bereits Pfeifer et al. (1952), während Kane et al. (1945) und Nubel & Ratajak (1962) mit nicht vorbehandelten Melassen arbeiteten, wobei letztere Arbeit wegen ihrer guten Ergebnisse in ausgesprochen kurzer Zeit (in 3 Tagen wurden 70,8 g/L Itaconsäure gebildet) auffällt. In den Patenten von Batti & Schweiger (1963) sowie v. Fries (1966) wurde ausdrücklich eine vorherige Reinigung der Melassen bzw. Zuckerdicksäfte durch Kationenaustausch empfohlen. Zusätzlich sollten evtl. schädliche Schwermetalle bei v. Fries (1966) durch eine Hexacyanoferrat(II)-Zugabe während der Wachstumsphase des Pilzes entfernt werden. Für die Produktionsphase schlug er eine Reduktion des Hexacyanoferrat-Spiegels auf unter 5 mg/L durch Zn^{2+} -Zugabe vor.

Im durchgeführten Versuch wäre eine Vorbehandlung der Melasse mit Ferrocyanid (Bindung von Eisen-Ionen) und Entkationisierung durch Ionenaustauscher notwendig gewesen. Dies würde jedoch erheblich den zeitlichen Aufwand steigern und damit Kosten für diese C-Quelle erhöhen.

5.3.2.2 Sauermilchmolke

Sauermilchmolke ist ein Abfallprodukt der milchverarbeitenden Industrie. Bei den durchgeführten Versuchen wurde Sauermilchmolke als Trockenpulver der Milchwerke Lippstadt verwendet. Die Sauermilchmolke wurde in sterilem Wasser bei 75°C für 5 min im Wasserbad pasteurisiert, um eine Ausflockung zu vermeiden. Schon nach einigen Tagen Inkubation bei 37°C geronn die Molke. Sie ist somit als C-Quelle für *Aspergillus terreus* NRRL 1963, der sein Temperaturoptimum bei 37°C hat, ungeeignet.

Zusammenfassung:

Beim Screening nach einer geeigneten C-Quelle für die Itaconsäurefermentation mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ergaben im durchgeführten Substratscreening Saccharose und Glucose die besten Verhältnisse zwischen Itaconsäureproduktion und Preis (s. Abb. 5-5). Die Preisangaben in der Abbildung 5-5 wurden neben der Literaturquelle Langendorf (1999) über persönliche Mitteilungen der Cerestar AG Dtl., persönliche Mitteilungen der AVEBE, persönliche Mitteilungen der FNR Gülzow und über Information des Internet unter www.cbott.com bezogen. Für Saccharose wurde neben dem Europäische Union (EU)- Preis auch der Preis für Saccharose außerhalb der EU aufgeführt. In Folgearbeiten sollten ausführliche Preisrecherchen zu den möglichen C-Quellen innerhalb und außerhalb der EU durchführen werden.

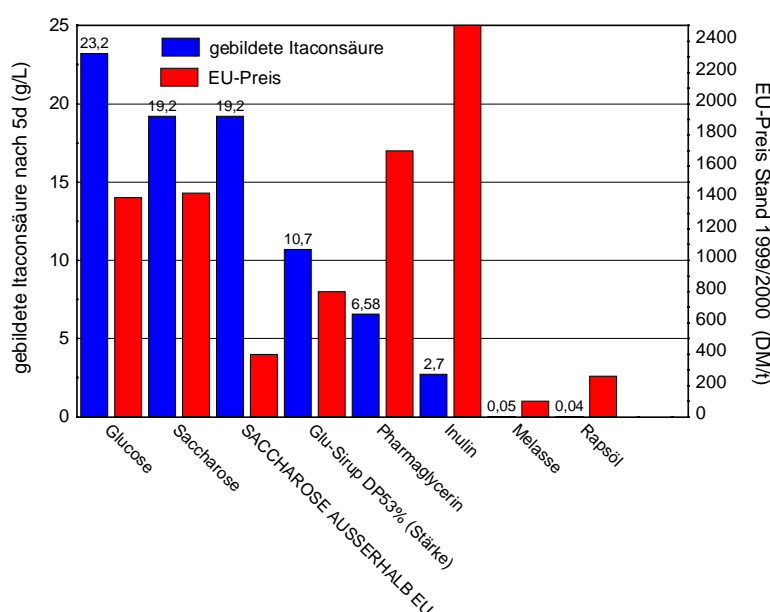


Abb. 5-5. Substratvergleich mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium mit 10% BFM
	Substrat:	100 g/L C-Quelle
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

5.4 Einflussfaktoren auf die Itaconsäureproduktion

5.4.1 Itaconsäurefermentation im 1,8-L Fermenter zur Beurteilung von Wachstumsverhalten und Itaconsäurebildung

Um einen biotechnischen Prozess optimal ausführen zu können, ist es unerlässlich vom verwendeten Produktionsstamm genaue Kenntnisse über sein Wachstum, seine Mediumsansprüche, Produktbildungen, Hemmungen etc. zu haben. Da aus der vorliegenden Literatur keine Arbeiten zu einer Itaconsäurefermentation mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 bekannt sind, wurde als erstes mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in Form von Vorversuchen eine Batch-Fermentation (Abb. 5-6) und eine Konti-Fermentation unter Aufnahme aller relevanten Parameter im 1,8-L Fermenter (s. Kap.4.5.2) durchgeführt.

Vorversuch Batch-Fermentation:

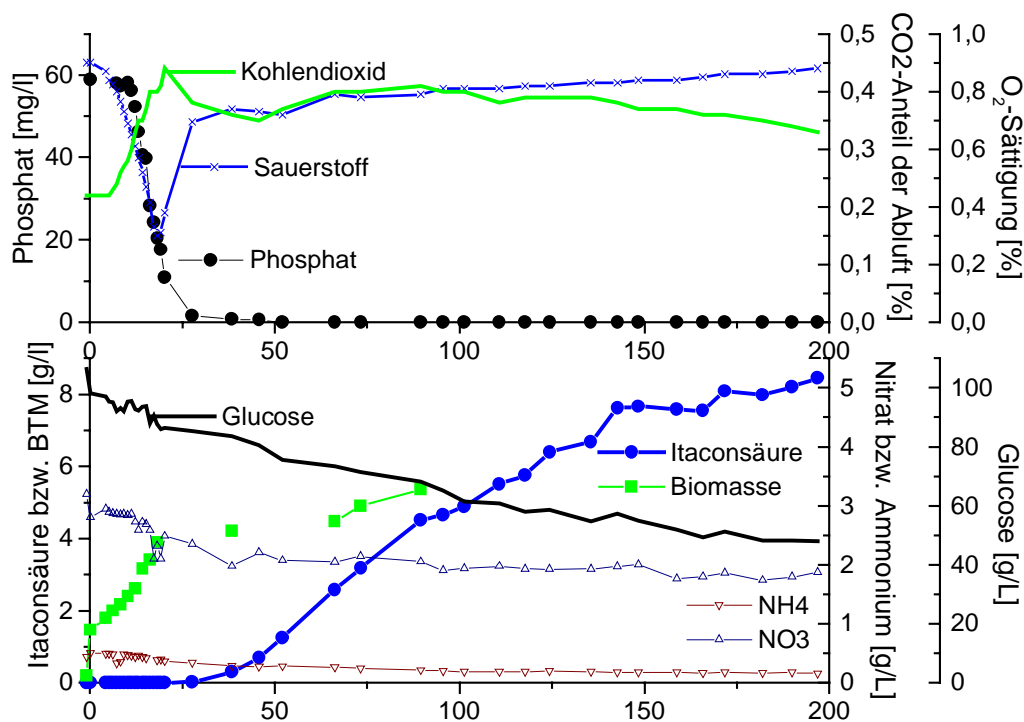


Abb. 5-6. Batch-Fermentation im 1,8-L-Fermenter mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963

Bedingungen:	Medium:	1L Wachstumsmedium
	Inokulum:	10 %, BTM 2,1 g/L
	Substrat:	100 g/L Glucose
	Grund-/Zusatzbegasung:	0,65 L/min / 1,35 L/min
	Rührerdrehzahl:	200 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1; eingestellt mit 4 M NaOH

Während der ersten Phase der Fermentation, die etwa 30 h dauerte, verbrauchte der Pilz erhebliche Mengen an Sauerstoff und schied entsprechend große Mengen Kohlendioxid aus. Da während dieser Zeit weder eine Produktion von Itaconsäure noch ein mittels HPLC nachweisbares anderes Produkt von relevanter Menge zu finden war, kann davon ausgegangen werden, dass der Stoffwechsel vornehmlich auf die Biomasseproduktion ausgerichtet war. Sowohl die Glucoseverbrauchsrate als auch der Verbrauch an Stickstoffverbindungen (Nitrat und Ammonium), die für die Proteinsynthese und somit die Bildung neuer Biomasse unerlässlich sind, wiesen während dieser ersten Phase höhere Abbauwerte auf, als im folgenden Teil der Fermentation. Nach Smith und Patman (1977) werden die Ammoniumionen zum Zellaufbau und zur Itaconsäureproduktion benötigt, Nitrat hingegen nur zum Wachstum, nicht aber zur Itaconsäureproduktion. Dies konnte in der durchgeführten Fermentation nicht bestätigt werden. Bis zur 30. Stunde nahm die Phosphatkonzentration auf unter 1 mg/L ab. Die Biomassekurve wies etwa zum gleichen Zeitpunkt einen ersten Knick auf, der auf ein Nachlassen des Wachstums zurückzuführen und in unmittelbarem Zusammenhang mit einer Phosphatlimitierung zu sehen ist. Die Beobachtungen zum Verbrauch der Stickstoff- und Phosphatverbindungen gaben Anlaß, den ***Einfluss von Stickstoff und Phosphat in Bezug auf Zellwachstum und Itaconsäureproduktion*** näher zu untersuchen.

Nach Verbrauch des vorhandenen Phosphats beginnt die 2 Phase der Itaconsäureproduktion, die Biomassevermehrung kommt fast vollständig zum Stillstand und die Itaconsäureproduktion beginnt. Die Itaconsäurebildung erfolgt wachstumsentkoppelt durch Phosphatlimitierung (Phosphat < 0,8 mg/L). Diese wichtige Beobachtung gab Anlaß; den ***Zusammenhang zwischen Phosphatbedarf und Itaconsäureproduktion während der Produktionsphase*** näher zu untersuchen.

Ebenfalls zum Zeitpunkt des Produktionsbeginns war eine Veränderung im morphologischen Erscheinungsbild des Pilzes festzustellen. Wuchs er in den ersten 30 Stunden filamentös heran, so dass der Reaktorinhalt zunehmend weißlich, undurchsichtig erschien, fand im Zeitraum zwischen 30. und 40. Stunde eine merkliche Veränderung hin zur rein pelletförmigen Erscheinungsform statt, wobei die Fermentationsflüssigkeit klar wurde. Auch die Veränderungen im Mycelwachstum gaben Anlaß den ***Zusammenhang zwischen Mycelwachstum und den Konzentrationen der einzelnen Medienbestandteile*** diesbezüglich näher zu untersuchen.

Zur Überprüfung der Konsistenz der Daten während der durchgeführten Batch-Fermentation im 1,8-L Fermenter wurde eine Kohlenstoffbilanz durchgeführt. Anhand der Kohlenstoffbilanz konnte abgeschätzt werden, ob das Substrat Glucose nur in Biomasse, Kohlendioxid und Itaconsäure umgesetzt wird, oder ob Nebenprodukte gebildet wurden, die durch die bestehende Analytik nicht ausreichend erfaßt wurden. Mit

$$\sum C = C_{\text{(Glucose)}} + C_{\text{(Itaconsäure)}} + C_{\text{(CO}_2\text{)}} + C_{\text{(Citronensäure)}} + C_{\text{(freie BTM)}} + C_{\text{(ads. BTM)}} \quad (5-1)$$

wurde eine C-Bilanz angenähert.

Die Mengen der zum Bilanzzeitpunkt vorliegenden Glucose, Itacon- sowie Citronensäure sind aus den analytischen Messungen per HPLC bekannt, die Biomasse aus den gravimetrischen Bestimmungen. Die gebildete Kohlendioxidmenge ist durch die kontinuierliche Messung im Abgasstrom zugänglich. Das Meßgerät lieferte jedoch lediglich den Volumenanteil an Kohlendioxid, der in den Massenanteil umgerechnet und mit der Durchflussrate multipliziert die zum Meßzeitpunkt produzierte Kohlendioxidmenge ergibt. Die Kohlendioxidmengen entsprechen den Flächen unter der in der Abbildung 5-7 dargestellten Kurve. Summiert man die so berechneten Kohlendioxidmengen vom Anfang bis zum Bilanzzeitpunkt auf, so erhält man die gesuchte Größe (s. Abb. 5-7).

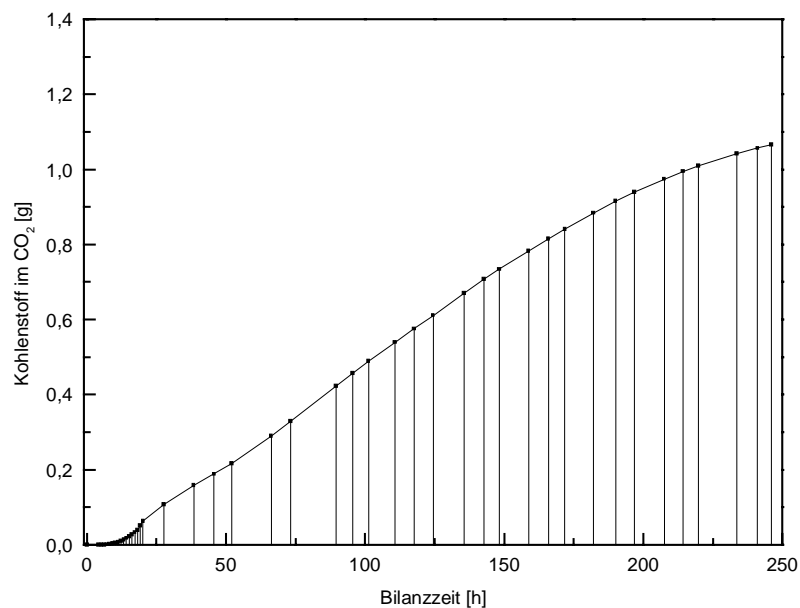


Abb. 5-7. Veranschaulichung des Summierungsverfahrens über die Fermentationszeit der Batch-Fermentation im 1,8-L Fermenter (aufsummierte Menge an Kohlenstoff im Abgas)

Als Kohlenstoffanteil der Biomasse wird hier der für Pilzmycel von Roels (1983) angegebene Wert von 49 % angenommen. Zieht man die Bilanz zu den verschiedenen Probenahmezeiten der Batch-Fermentation, so ergibt sich die Abbildung 5-8.

Deutlich zu erkennen ist die mit zunehmender Zeit größer werdende "Kohlenstoffnachweis-lücke" (unschraffierte Fläche in der Abb. 5-8), die gegen Ende der Fermentation auf ca. 35 % des eingesetzten Kohlenstoffs anwächst. Einzelne Nebenprodukte von größerer Bedeutung waren mit den angewendeten Analysemethoden nicht auszumachen. Die Differenz zwischen Kohlenstoffinput und -output kann aber darauf zurückgeführt werden, dass die gemessenen BTM-Gehalte mit zunehmender Fermentationszeit erheblich zu niedrig waren, da sich ein großer Teil der Biomasse sessil im Reaktor befand.

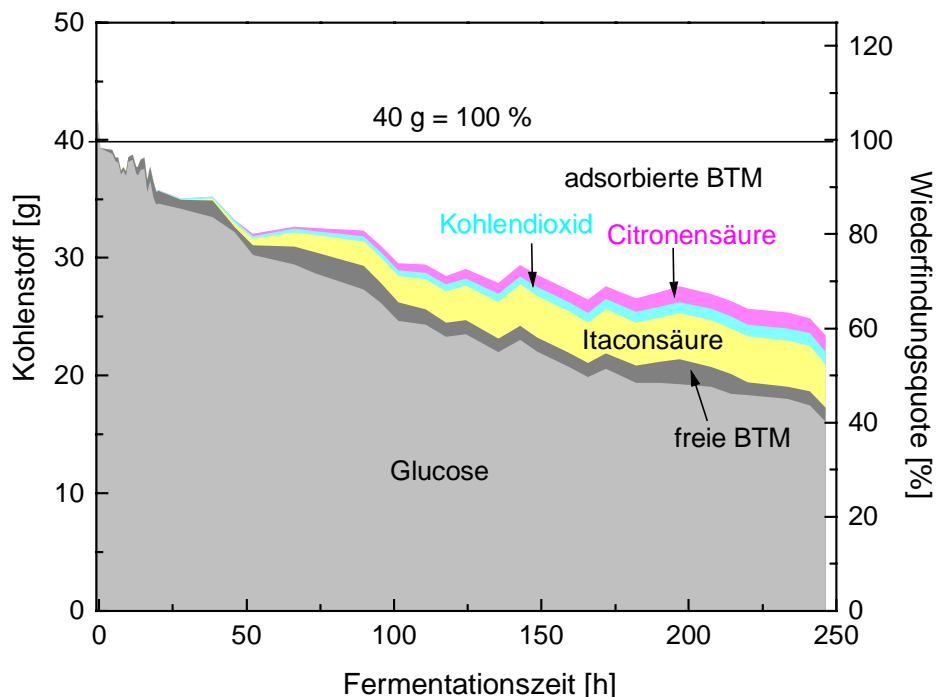


Abb. 5-8. Kohlenstoffbilanz über den Zeitraum der Batch-Fermentation im 1,8-L-Fermenter

Die Größenordnung der sessilen (an den Fermenterteilen adsorbierten) BTM ergibt sich aus einer im Zusammenhang mit der Reinigung des Reaktors nach Beendigung der Fermentation durchgeführten Bestimmung. Bei der Reinigung wurden ca. 37 g BTM aus dem Reaktor entfernt, welche etwa 18 g Kohlenstoff entsprechen.

Die große analytische "Kohlenstoffnachweislücke" von rund 16 g kann als geschlossen gelten, da sich bei ca. 18 g Kohlenstoff als sessile Biomasse, die sich durch die Reinigung ergeben haben, eine Wiederfindungsrate von 105 % ergäbe. Dies entspricht einer Fehlerquote von 5 %. Abschließend konnte anhand der Kohlenstoffbilanz festgestellt werden, dass das Substrat Glucose nur in Biomasse, Kohlendioxid, Itaconsäure und zu einem geringen Anteil zu Citronensäure umgesetzt wird. Demzufolge waren **keine weiteren Untersuchungen zur Bildung eventueller Nebenprodukte** nötig.

Vorversuch Konti-Fermentation:

Um weitere Informationen über Ansprüche und Verhalten des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 auch während einer kontinuierlichen Fermentation zu erhalten, wurde der Vorversuch Konti-Fermentation im veränderten 1,8-L Fermenter (s. Kap. 4.5.2, Abb. 4-11), unter sonst gleichen Prozessbedingungen wie bei der eingangs vorgestellten Batch-Fermentation, durchgeführt.

Die kontinuierliche Fermentation besitzt gegenüber der Batch-Fermentation den Vorteil der gleichbleibenden Prozessbedingungen, sobald ein steady state (Fließgleichgewicht) erreicht ist. Bei kontinuierlicher Betriebsweise ist die Durchflussrate höchstens auf den Wert der maximalen Wachstumsrate einzustellen, da oberhalb dieses Wertes ein Auswaschen der Zellen zu verzeichnen ist.

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde aus der eingangs vorgestellten Batch-Fermentation (s. Abb. 5-6) ermittelt und wird im folgenden dargestellt.

Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 während einer Batch-Fermentation im 1,8-L Fermenter:

Zur Beschreibung der Kinetik des Zellwachstums wird gewöhnlich das Monod-Modell herangezogen. In seiner einfachsten Form eines substratlimitierten Wachstums lautet es:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_S} \quad (5-2)$$

Dabei bedeuten:

- μ : aktuelle spezifische Wachstumsrate
- μ_{\max} : maximale spezifische Wachstumsrate
- $[S]$: Konzentration des limitierenden Substrats
- K_S : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats.

Die maximale, spezifische Wachstumsrate kann auch direkt aus den aufgenommenen Biomassedaten in der exponentiellen Wachstumsphase abgeschätzt werden. Dazu wird die nach Malthus für die Biomassezunahme angesetzte Gleichung integriert und nach der spezifischen Wachstumsrate μ aufgelöst:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (5-3)$$

$$\mu = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{t_2 - t_1} \quad (5-4)$$

X_1 und X_2 : Biomasse zu den Zeitpunkten t_1 bzw. t_2 .

Legt man in einer halblogarithmischen Auftragung durch die Messpunkte der exponentiellen Phase mittels linearer Regression eine Gerade, so stellt deren Steigung die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit dar. Aus der Abbildung 5-9, bei der die Daten aus der eingangs vorgestellten Batch-Fermentation im 1,8 L Fermenter zugrunde gelegt wurden, ergibt sich auf diese Weise ein Wert für μ_{\max} von $0,09 \text{ h}^{-1}$.

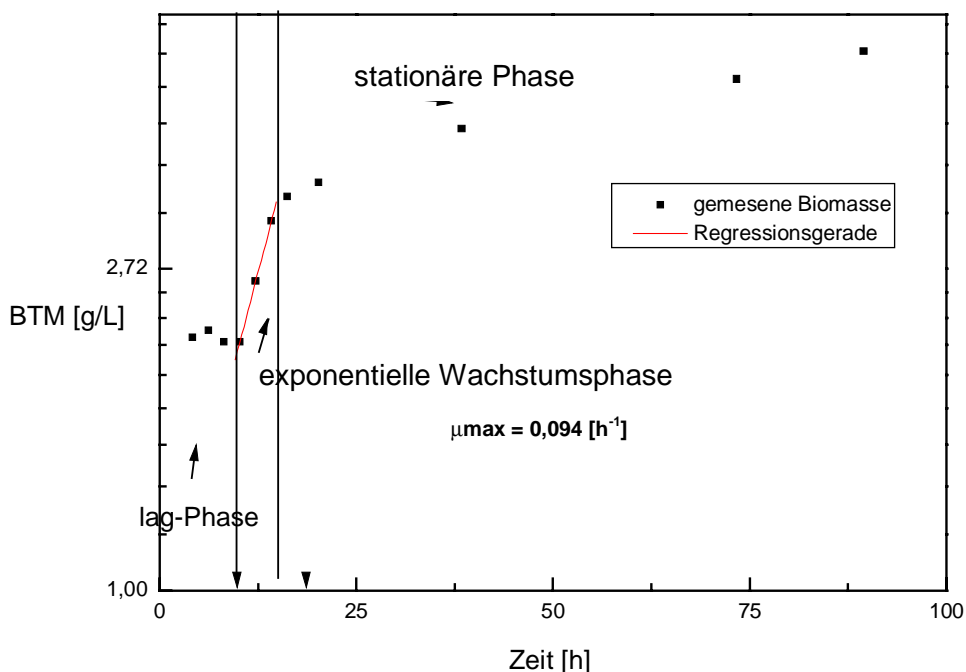


Abb. 5-9. Direkte Bestimmung von μ_{\max} mit Hilfe einer Regressionsgerade durch die Messpunkte der exponentiellen Wachstumsphase bei halblogarithmischer Auftragung

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von μ_{\max} besteht darin, die aufgenommenen Biomassendaten zunächst durch eine geeignete Funktion zu approximieren, um diese dann nach der Zeit zu differenzieren. Nach der Gleichung (5-4) von Malthus ergibt sich die spezifische Wachstumsrate μ dann aus dem Quotienten der differentiellen Änderung der Biomasse mit der Zeit durch die zu diesem Zeitpunkt vorhandene Biomasse:

$$\mu = \frac{dX/dt}{X} \quad (5-5)$$

Für die Annäherung erweist sich eine logistische Funktion als nützlich, die nach dem auf dem Prinzip der Minimierung der Fehlerquadrate basierenden Levenberg-Marquardt-Algorithmus gewonnen wurde. Der Verlauf und die Parameter sind der Abbildung 5-10 zu entnehmen.

Im oberen Teil dieser Abbildung sind die erste Ableitung dieser Funktion sowie der Verlauf des Quotienten aus erster Ableitung durch die logistische Funktion selbst dargestellt. Letztere Kurve entspricht dem angenäherten Verlauf der spezifischen Wachstumsrate μ über den Untersuchungszeitraum hinweg.

Der bei ca. 14 h abzulesende maximale Wert beträgt $\mu_{\max} = 0,085 \text{ h}^{-1}$

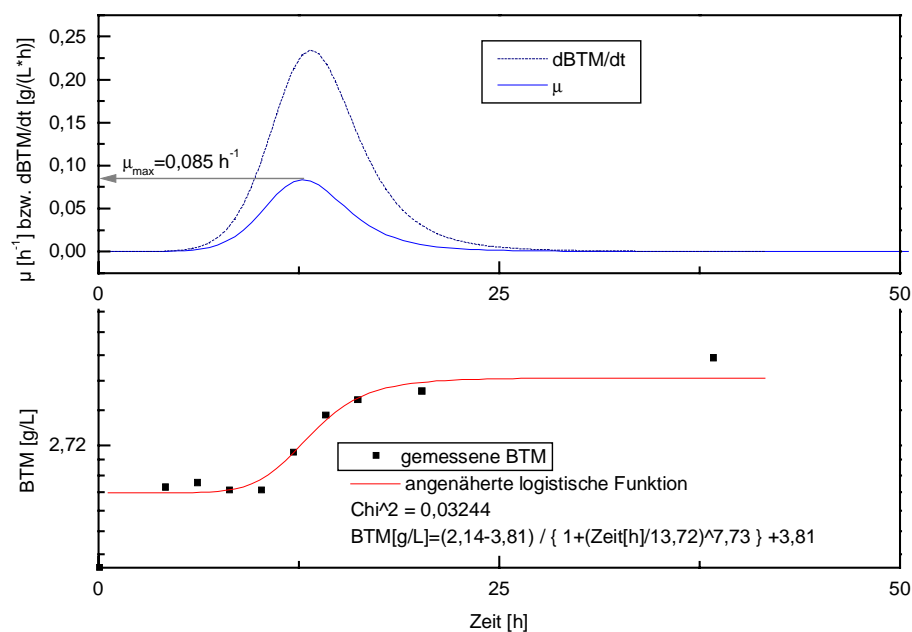


Abb.5-10. Bestimmung von μ_{\max} mit Hilfe einer an die Biomasseentwicklung angepassten logistischen Funktion

Die für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ermittelte **maximale spezifische Wachstumskonstante von rund $0,09 \text{ h}^{-1}$** liegt, verglichen mit den für die Stämme *Aspergillus terreus* NRRL 1960 und *Aspergillus terreus* K26 veröffentlichten Zahlen bei vergleichbaren Wachstumsbedingungen, deutlich über den bei Batchkulturen publizierten Werten von $0,014 \text{ h}^{-1}$ [Rychtera & Wase 1981] bzw. $0,035 \text{ h}^{-1}$ [Kobayashi & Nakamura 1966] sowie bei kontinuierlicher Betriebsführung von $0,04 \text{ h}^{-1}$ [Rychtera & Wase 1981] bzw. $0,026 \text{ h}^{-1}$ [Kobayashi & Nakamura 1966].

Im Anschluss an die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate wurde der Vorversuch Kontinuierliche Fermentation durchgeführt. Nach einer anfänglichen 42 stündigen Batch-Anwuchsphase wurde die kontinuierliche Fermentation zunächst mit einer Durchflussrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ gefahren. Diese Flussrate sollte deutlich unterhalb von μ_{\max} liegen und wurde deshalb bis zur 180. Stunde der Fermentation beibehalten. Danach wurde auf $0,1 \text{ h}^{-1}$ erhöht, um zu untersuchen ob oberhalb des für μ_{\max} festgestellten Wertes ein Auswaschen der Biomasse zu beobachten ist.

Die kontinuierliche Betriebsweise erlaubt das Einstellen von quasi-stationären Zuständen, die nach ca. 5 Verweilzeiten erreicht werden. Die Tabelle 5-4 stellt für die eingestellten Verdünnungsraten $0,06 \text{ h}^{-1}$ und $0,1 \text{ h}^{-1}$ die verschiedenen Konzentrationen im Zu- und Ablauf sowie Ausbeute und volumetrische Produktivität zu diesen Zeitpunkten gegenüber.

Tab. 5-4. Konzentrationen und andere Betriebskennzahlen im Zu- und Ablauf

Durchflussrate	$0,06 \text{ h}^{-1}$		$0,1 \text{ h}^{-1}$	
	Zufluss	Abfluss	Zufluss	Abfluss
Glucose [g/L]	82,9	68,8	82,9	76
Itaconsäure [g/L]	0	0,3	0	0,15
Phosphat [mg/L]	93	0-4	73	12
O ₂ -Sättigung [%]		36-50		0
CO ₂ [Vol.%]	0,044	0,13	0,044	0,044
vol. Produktivität [$\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$]	0,017		0,022	
Ausbeute [mol%]	2,8		4,4	

Während des gesamten Vorversuches Kontinuierliche Fermentation wurde mit den gegebenen Prozeßparametern nur eine sehr geringe Itaconsäureproduktion erreicht (Tab. 5-4).

Mit zunehmender Fermentationszeit war ein immer weiter voranschreitendes Oberflächen- und Randwachstum zu beobachten. Der gesamte Reaktorinhalt bestand am Ende der Fermentation aus einer großen kompakten Mycelmasse, die alle Einbauteile überwucherte. Das etwa zur 300. Stunde gemachte Photo (Abb. 5-11) des Fermenterinhalt des kontinuierlichen Fermentation verdeutlicht dies eindrucksvoll.

Das starke sessile Wachstum mag auch erklären, warum es bei einer Verdünnungsrate von $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ nicht zu einem langsamen Auswaschen der Zellbiomasse kam, obwohl der für die maximale Wachstumsgeschwindigkeit festgestellte Wert von $\mu_{\max}=0,09 \text{ h}^{-1}$ überschritten wurde.



Abb. 5-11. Sessiles Mycel nach 300 Stunden kontinuierlicher Fermentation

Während der Durchflussrate von $0,06 \text{ h}^{-1}$ war im Ablauf die meiste Zeit über kein und am Ende des Zeitraums ca. 4 mg/L Phosphat nachweisbar. Es stellte sich bei der höheren Flussrate von 100 mL/h eine etwa dreifach höhere Phosphatkonzentration von ca. 12 mg/L ein. Berücksichtigt man die mit 93 mg/L bzw. 73 mg/L etwas unterschiedlichen Konzentrationen im Zufluss, so ergibt sich ein um rund ein Drittel niedrigerer Phosphatverbrauch bei der höheren Flussrate trotz gestiegener Biomasse. Das bedeutet, dass während der höheren Verdünnungsrate keine Phosphatlimitierung mehr gegeben war, die hingegen bei der niedrigeren Flussrate nicht ausgeschlossen werden kann und am Ende der Batch-Phase mit Sicherheit vorlag.

Die Beobachtungen und Ergebnisse des Vorversuches Kontinuierliche Fermentation verdeutlichen sehr eindrucksvoll, mit welchen Schwierigkeiten bei einer Fermentation mit freien Zellen des Mycelbildners *Aspergillus terreus* NRRL 1963 zu rechnen ist. Aus den Beobachtungen der durchgeführten Fermentation wurde erneut deutlich, dass besonders der Einfluß der Phosphatkonzentration im Medium zu untersuchen bzw. zu optimieren ist.

Schlussfolgerungen zur Batch-u. Konti-Fermentation freier Zellen:

Die Ergebnisse beider Fermentationen lieferten die entscheidenden Informationen für die in den folgenden Kapiteln durchgeführten Optimierungsversuche. Der Schwerpunkt der Optimierungsversuche wurde auf die Optimierung der Medienzusammensetzung für die Itaconsäureproduktion gelegt und lag bei der Untersuchung des Bedarfs an Spurenelementen und mineralischen Bestandteilen, die einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und den Umsatz haben. Desweiteren sind Untersuchungen zu Substrat- und Produkthemungen notwendig.

Alle in den folgenden Kapiteln durchgeführten Optimierungsversuche wurden in kleinen Testansätzen (250 mL- Erlenmeyerkolben) durchgeführt. Es wurde 10% BFM des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in 100 mL B&S-Produktionsmedium bei einem Anfangs-pH von 3,1 und einer Rotationsschüttlerfrequenz von 120 Upm im Dunkeln durchgeführt. Am Ende aller Versuche erfolgte eine Substrat-, Produkt- und Biomassebestimmung.

5.4.2. Stickstoff / Phosphat-Verhältnis

Einleitung:

In den meisten Arbeiten der Literatur wurde der Stickstoffbedarf mit Ammoniumnitrat oder mit Ammoniumsulfat gedeckt. Pfeifer et al. (1952) fanden heraus, dass Ammoniumnitrat als N-Quelle für *Aspergillus terreus* ungeeignet ist. Dies widerspricht den frühen Ergebnissen von Moyer & Coghill (1945) ebenso wie vielen späteren Veröffentlichungen [z.B. Batti & Schweiger 1963, Okabe et al. 1993], in denen Ammoniumnitrat als N-Quelle zu hohen Ausbeuten führte. Einig sind sich die Autoren, die die Auswirkung verschiedener N-Verbindungen auf die Itaconsäureproduktion untersuchten, dass Harnstoff für die Itaconsäureproduktion nicht geeignet ist [Moyer & Coghill 1945, Pfeifer et al. 1952, Nelson et al. 1952]. In den Patenten von Nubel & Ratajak (1962) und v. Fries (1966) werden ohne Zusatz von wesentlichen mineralischen N-Quellen gute Ergebnisse erzielt. Der gesamte Bedarf wird dort aus dem Stickstoffgehalt der Melasse gedeckt. Der vorhandene Stickstoffgehalt wurde in den besagten Arbeiten jedoch nicht bestimmt.

Dawson et al. (1989) beschrieben, dass bei der Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* eine Stickstoff- / Phosphatlimitierung die Ausbeuten steigert und die Prozesskontrolle erleichtert. Auch für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde der Einfluss von Stickstoff und Phosphat auf die Itaconsäurebildung und das Wachstum untersucht. Für diese Untersuchung wurde der Pilz in mehreren kleinen Testansätzen mit B&S-Produktionsmedium und verschiedenen Anfangskonzentrationen an KH_2PO_4 und NH_4NO_3 inkubiert. Nach Abbruch der Versuche erfolgte die Bestimmung der gebildeten Biomasse und die Bestimmung der produzierten Itaconsäure. Die Abbildung 5-12 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder.

Ergebnis:

Aus der Abbildung 5-12 wird deutlich, dass das vorliegende Stickstoff-/Phosphatverhältnis im Medium einen entscheidenden Einfluss auf die Itaconsäurebildung und das Wachstum hat. Bei zu niedrigen Anfangskonzentrationen an NH_4NO_3 im Medium ($< 2 \text{ g/L}$) kommt es, egal ob KH_2PO_4 im Medium enthalten ist oder nicht, kaum zum Wachstum, noch zur Itaconsäureproduktion. Das Gleiche gilt für zu niedrige Anfangskonzentrationen an KH_2PO_4 ($< 40 \text{ mg/L}$). Der Versuch der Abb. 5-12 zeigt, dass erst ab KH_2PO_4 -Konzentrationen über 80 mg/L die Itaconsäurebildung in Verbindung mit NH_4NO_3 -Konzentrationen von über 2 g/L sprunghaft ansteigt.

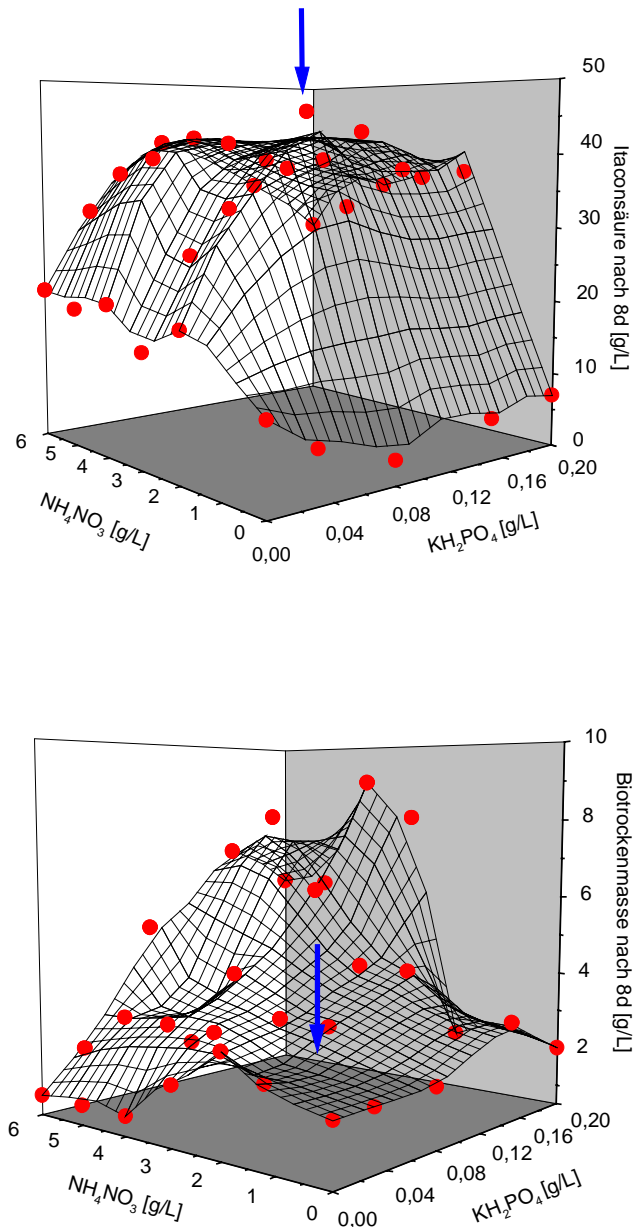


Abb. 5-12. Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an NH_4NO_3 und KH_2PO_4 auf die Itaconsäureproduktion und das Biomassewachstum (dicker Pfeil entspricht dem optimalen Verhältnis zwischen Stickstoff und Phosphat)

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Inokulum:	10 %, BTM, 2 g/L BTM
	Substrat:	94 g/L Glucose
	Schüttelfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert	37°C, 3.1

Während des eingangs durchgeführten Vorversuches Batch-Fermentation mit Wachstumsmedium (s. Abb. 5-6) wurde jedoch festgestellt, dass die Itaconsäurebildung wachstumsentkoppelt durch Phosphatlimitierung bei $\text{KH}_2\text{PO}_4 < 0,8 \text{ mg/L}$ erfolgt. Nach den Ergebnissen der Abbildung 5-12 muss diese Aussage in Bezug auf das optimale Verhältnis der

Anfangskonzentrationen an Stickstoff und Phosphat im Produktionsmedium für den Batch-Ansatz erweitert werden. Eine Erklärung für die Unterschiede der benötigten Phosphatkonzentration zum Einsetzen der Itaconsäureproduktion kann zum einen in der unterschiedlichen Zusammensetzung beider Medien begründet sein, womit komplexe Zusammenhänge zwischen den einzelnen Medienbestandteilen deutlich werden. Eine weitere Erklärung liefert vermutlich aber die während des Versuches der Abb. 5-12 gemachte Beobachtung, dass *Aspergillus terreus* NRRL 1963 Phosphat adsorbiert. Eine Erklärung hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit leider nicht gefunden, erklärt jedoch die höheren Anfangs-Phosphatkonzentrationen im Produktionsmedium. Für eine genaue Definition der optimalen Phosphatkonzentration im Produktionsmedium sollten in folgenden Arbeiten die Ursachen für dieses Verhalten aufgeklärt werden. Im durchgeführten Versuch lag das optimale N/P-Verhältnis (dicker Pfeil in der Abb. 5-12) in Bezug auf eine hohe Itaconsäureproduktion und einem minimalem Wachstum bei 2 g/L NH_4NO_3 /0,08 g/L KH_2PO_4 . Hier wurden nach 5d Inkubation 32 g/L und nach 8d Inkubation 49 g/L Itaconsäure gebildet.

5.4.3. Zusammenhang von Magnesiumbedarf, Biomassewachstum und Itaconsäureproduktion

Einleitung:

Die Anwesenheit von Magnesium ist in Zellwänden, Membranen, Ribosomen und aktiven Komplexen mit Phosphatestern notwendig. Magnesiumionen sind Cofaktoren der Kinasen. Ferner bewirkt ein Überschuss an Magnesium bei *Aspergillus terreus* maximale Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität. Citratsynthetase und Isocitrat-Dehydrogenase sind die Schlüsselenzyme im Tricarbonsäure-Zyklus. Die Citrat-Synthetase ist sowohl während der Wachstums- als auch während der Produktionsphase aktiv, die Isocitrat-Dehydrogenase hingegen nur während der Wachstumsphase [Bagavant et al 1994]. Pilze und alle übrigen Organismen benötigen von einigen anorganischen Komponenten, die mit dem Nährmedium angeboten werden müssen, sehr geringe Mengen. In der Regel genügen davon Konzentrationen in der Größenordnung Milligramm pro Liter oder geringer. Die für Pilze vergleichsweise hohe erforderliche Magnesiumsulfatkonzentration wird mit einer dadurch bedingten erhöhten Säuretoleranz des Pilzes erklärt [Lockwood & Reeves 1945].

Ergebnis:

Der Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ auf die Itaconsäureproduktion und das Wachstum von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde in kleinen Testansätzen im Bereich zwischen 0-6 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ überprüft. Deutliche Unterschiede konnten in diesem Bereich für die Itaconsäurebildung und das Wachstum nicht festgestellt werden. In allen nachfolgenden Versuchen wurde deshalb die bereits bekannte und eingesetzte Konzentration von 1 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ eingesetzt.

5.4.4 Zusammenhang von Calciumbedarf, Biomassewachstum und Itaconsäureproduktion

Einleitung:

Teilweise wurde in früheren Arbeiten beobachtet, dass die Zugabe von unlöslichen Stoffen, die für ihre adsorbierenden Eigenschaften bekannt sind, eine deutliche Ertragssteigerung bei der Itaconsäureproduktion erbrachte. So schlugen Larsen & Hovden (1956) in ihrem Patent u.a. Suspensionen von Gips, Kieselsäure oder Kaolin vor. Ihre volle Wirkung konnten diese Stoffe aber erst nach einem Aktivierungsprozess entfalten, der z. B. beim Gips im Brennen bestand. Gyamerah (1995a) machte ähnliche Beobachtungen und empfahl ein Brennen des Gipses bei 900°C vor dem Einsatz. Die von manchen Autoren vertretene Ansicht, die hohe Ca^{2+} -Konzentration diene der Hemmung der Itaconatoxidase, um eine Umsetzung in Itaweinsäure zu unterbinden [Crueger & Crueger 1989], konnte im Rahmen eigener Untersuchungen nicht bestätigt werden, da auch bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen keine Itaweinsäure mittels HPLC nachgewiesen wurde. Diese Aussage stimmt mit den Untersuchungen von Jakubowska (1977) überein, die zwar geringe Spuren an Itaweinsäure als Nebenprodukt der Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* fand, diese aber nicht auf einen Abbau zur Itaconsäure zurückführen konnte.

Der Einfluss von $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ auf die Itaconsäureproduktion und das Wachstum von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde durch Versuche mit fünf verschiedenen Anfangskonzentrationen an Calciumchlorid (0-12 g/L) im B&S-Produktionsmedium überprüft. Zunehmende $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Konzentration erbrachten eine deutliche Ertragssteigerung bei der Itaconsäureproduktion. Das filamentöse Pellet veränderte sich mit steigender CaCl_2 -Konzentrationen von feinem filamentösem Mycel zu festen kleinen Pellets.

Da bekannt war, dass auch das Phosphat einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum und Itaconsäurebildung des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 hat, wurden im Anschluss an die Versuche zum Calciumchlorideinfluss Versuche durchgeführt, die einen möglichen Zusammenhang zwischen Phosphat und Calcium in Bezug auf die veränderte Mycelform und die Erträge aufklärt. Für diese Untersuchung wurde der Pilz in mehreren kleinen Testansätzen mit B&S-Produktionsmedium und verschiedenen Anfangskonzentrationen an $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 inkubiert. Die Abbildung 5-13 gibt die erhaltenen Ergebnisse wieder.

Ergebnis:

Während der durchgeführten Versuche der Abb. 5-13 wurde festgestellt, dass die kleine feste Pelletbildung nur bei hohen Calciumkonzentrationen auftrat, unabhängig welche Phosphatkonzentration gewählt wurde. Einen Zusammenhang zwischen Phosphatkonzentration und Calciumkonzentration in Bezug auf die veränderte Mycelform in Verbindung mit hohen Erträgen konnte nicht festgestellt werden.

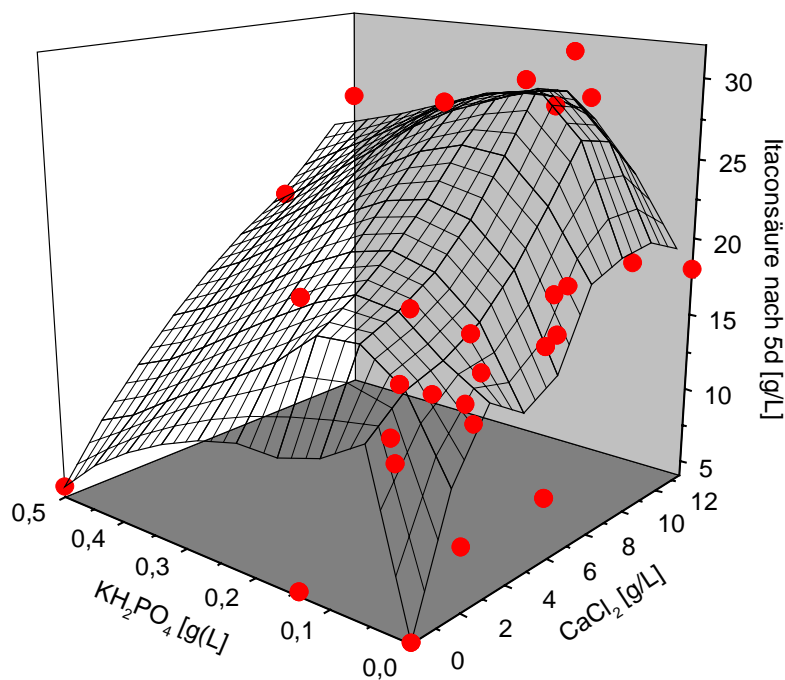


Abb. 5-13. Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Inokulum:	10 % BTM
	Substrat:	96 g/L Glucose
	Schüttelfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Das Wachstum des Pilzes nahm bei niedrigen, wie auch bei hohen Calciumkonzentrationen mit steigenden Phosphatkonzentrationen kontinuierlich zu. Calcium besitzt demnach einen Einfluss auf die Wachstumsform, nicht aber auf das Wachstum selbst. Bei steigender Calciumkonzentrationen kam es desweiteren zu Ausfällungen. Sehr hohe Calciumkonzentrationen in Verbindung mit hohen Sulfatspiegeln führten zum Überschreiten des Löslichkeitsprodukts und somit zu einem Ausfällen des Calciumsulfats im Medium. Die bisher eingesetzten Mengen an Calciumchlorid im B&S-Produktionsmedium lagen, wie aus der Abbildung 5-13 ersichtlich, bereits im optimalen Bereich. Mit 10 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 0,2 g/L KH_2PO_4 wurden wie schon in vorangegangenen Versuchen nach 5d ca. 25 g/L Itaconsäure gebildet. Die Ursache der deutlichen Ertragssteigerung bei zunehmenden Calciumkonzentrationen bzw. auch die Veränderung des filamentösen Pellet von feinem filamentösen Mycel zu festen kleinen Pellets lag nicht im Verhältnis zwischen Calcium und Phosphat, sondern im hohen Calciumspiegel verbunden mit den Spurenelementen Kupfer und Zink, die neben Calcium ebenfalls im B&S-Produktionsmedium enthalten waren. Im folgenden Kapitel wird auf diesen Sachverhalt ausführlich eingegangen.

5.4.5 Einfluss der Spurenelemente Vanadium, Molybdän, Bor, Kalium, Kobalt, Aluminium, Kupfer, Mangan, Zink & Eisen

Einleitung:

Die in Abgrenzung zu den Makroelementen als Spurenelemente bezeichneten Stoffe haben insbesondere als integrale Bestandteile von Enzymen und bei der Regulation des Säure / Basen- und Elektrolythaushalts eine entscheidende Bedeutung für Katabolismus und Anabolismus. Ohne ausreichende Versorgung an Spurenelementen ist kein Organismus zu Stoffwechselhöchstleistungen befähigt. Andererseits wirken viele dieser Spurenelemente, wenn sie im Übermaß vorliegen, hemmend. Beim Ziel einer Optimierung eines biotechnischen Prozesses, wie in diesem Fall der Itaconsäureproduktion, ist auch immer ein Augenmerk auf die auf Organismus und gewünschtes Produkt ausgerichtete, angemessene Versorgung mit Spurenelementen zu richten.

Bei biotechnischen Prozessen ist der Bedarf an den meisten Spurenelementen so gering, dass er durch die mit den Mediumskomponenten als Verunreinigung eingetragenen Mengen gedeckt werden kann. Ziel in diesem Kapitel war es, diejenigen Spurenelemente zu identifizieren, deren Bedarf für eine effiziente Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 über dieses Maß hinaus geht. Hinweise auf ähnliche Untersuchungen finden sich für den Stamm NRRL 1960 bei Lockwood & Reeves (1945), die nur bei der Zugabe von Zink einen positiven Effekt auf die Itaconsäurebildung feststellten, nicht jedoch bei 1-100 mg/L Mangan, Molybdän, Kobalt, Kupfer, Nickel, Chrom, Gallium und Bor.

Lockwood & Ward (1945) führten Oberflächenkulturfermentationen mit *Aspergillus terreus* in Aluminiumschalen bei pH 2 durch. Da von Beschichtungen des Aluminiums nichts erwähnt wird, ist davon auszugehen, dass ein Teil des Aluminiums aufgrund der Acidität des Mediums in Lösung gebracht wird und auf die Zellen einwirken kann. Lockwood & Reeves (1945) stellten eine ausgesprochen toxische Wirkung des Aluminiums in einer Konzentration von 5-10 mg/L fest, die aber durch die Anwesenheit von 0,82 mg/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ vermindert werden konnte. Insofern wird die Wirkung von Aluminium ebenfalls untersucht. Darüber hinaus wurden die Elemente Vanadium, Bor, Molybdän und Kobalt untersucht.

In einem einführenden Versuch wurden die Spurenelemente Bor, Aluminium, Molybdän, Vanadium, Kobalt und Zink auf ihren Einfluss auf den Itaconsäurebildungsprozess hin untersucht. In 6 Erlenmeyerkolben wurden zum B&S-Produktionsmedium die in der Tabelle 5-5 angegebenen Konzentrationen der Spurenelemente zugegeben.

Die Elemente Kupfer, Zink, Eisen und Mangan werden wegen Ihrer besonderen Bedeutung für die Itaconsäureproduktion in eigenen Abschnitten in diesem Kapitel behandelt.

Tab. 5-5. Verbindungen und Endkonzentration der untersuchten Spurenelemente

Spurenelement	Verbindung	Konzentration der Verbindung in Ansätzen [mg/L]
Bor	H ₃ BO ₃	0,10
Aluminium	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,15
Molybdän	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10
Kalium	K ₂ SO ₄	100
Vanadium	VCl ₃	0,10
Kobalt	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10
Zink	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00

Nach dem Animpfen der Kolben mit 10% BFM des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 und Bebrütung der Kolben bei 37°C, pH 3,1 und 120 Upm erfolgte nach jeweils 4, 6 und 14 Tagen eine Probenahme. Die gemessenen Itaconsäurekonzentrationen sind in der Abbildung 5-14 wiedergegeben, wobei alle Konzentrationen auf die jeweiligen Werte der Ansätze ohne zusätzliche Zugabe von Spurenelementen bezogen sind.

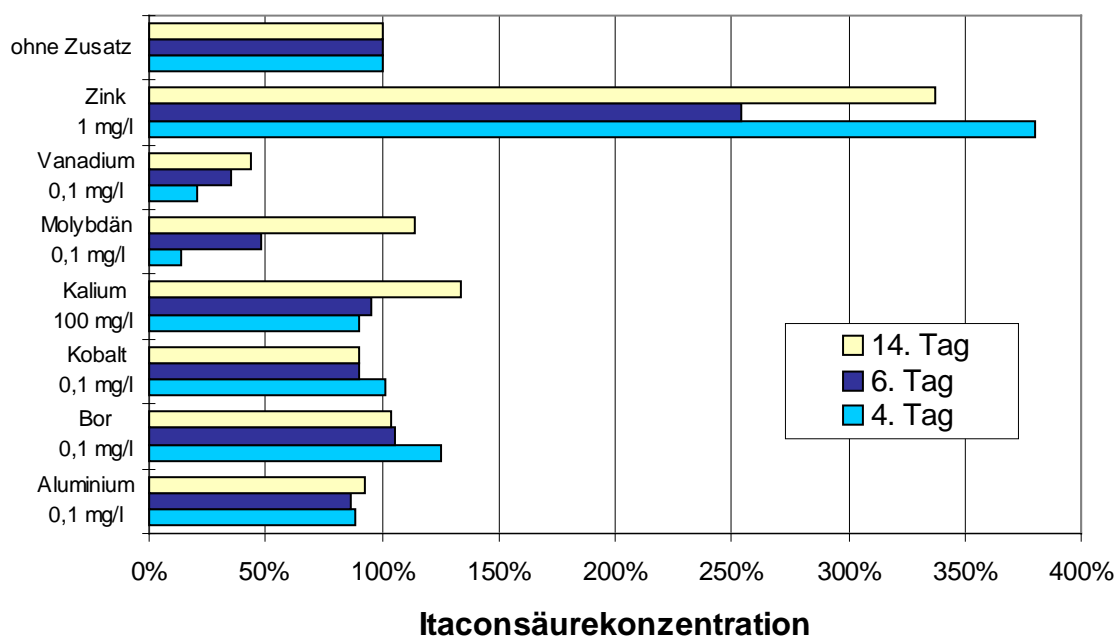


Abb. 5-14. Itaconsäurekonzentrationen bei Anwesenheit verschiedener Spurenelemente (Werte normiert auf Ansätze ohne zusätzliche Spurenelemente am jeweiligen Tag)

Ergebnis:

Die Proben des Versuches aus der Abbildung 5-14 wurden bezüglich der entsprechenden Spurenelemente mittels atomabsorptionsspektrometrischer Bestimmung (Kap. 4.1.6) und auf die gebildete Itaconsäure hin untersucht. Aus den präsentierten Ergebnissen lassen sich zwischen den untersuchten Spurenelementen bei den getesteten Spurenelementkonzentrationen deutlich drei Gruppen identifizieren:

- Elemente, deren Zugabe sich negativ auf die Itaconsäureproduktion auswirkt
- Elemente, die sich hinsichtlich der Itaconsäureproduktion indifferent verhalten
- Elemente, die bei Zugabe einen fördernden Einfluss auf die Itaconsäureproduktion ausüben.

Zur ersten Gruppe der sich negativ auf die Itaconsäureproduktion auswirkenden Elemente sind **Vanadium und Molybdän** zu zählen. Beim Vanadium ist sicher die dargereichte Verbindung Vanadium(III)trichlorid für die giftige Wirkung verantwortlich, was sich u.U. im Falle eines anionischen Vanadats, in dem Vanadium in der Oxidationsstufe +V vorliegt, anders verhielte. Beim Vanadat-Einsatz wäre allerdings die inhibierende Wirkung auf ATPasen zu berücksichtigen, wenn das Vanadat intrazellulär vorliegt [Stryer 1990]. Die giftige Wirkung der hier getesteten Molybdänkonzentration lässt mit der Zeit nach, so dass am 14. Tag der Inkubation gegenüber den Ansätzen ohne zusätzliche Spurenelemente keinerlei Nachteil mehr besteht. Diese retardierende Wirkung ließe sich durch einen Adaptionsmechanismus des Pilzes für dieses Metall erklären, dessen genetische Induzierung einige Tage in Anspruch nähme.

Der zweiten Gruppe, die Elemente, die sich in der getesteten Konzentration weder positiv noch negativ auf die Itaconsäureproduktion auswirken, gehören **Kobalt, Bor, Aluminium und auch Kalium** an. Die durch das Aluminiumsalz gleichzeitig eingetragene Menge an Kalium führt zu einer Konzentration von 0,15 mg/L K^+ und ist ohne Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass eine fast 700fach höhere Konzentration in den Ansätzen mit 100 mg/L K^+ ebenfalls keine signifikante Wirkung hat. Die beschriebene Empfindlichkeit des Prozesses gegenüber hohen Kaliumkonzentrationen [Bigelis & Arora 1992] kann für den hier untersuchten Stamm NRRL 1963 nicht bestätigt werden.

Eine **Zinkzugabe** von 1 mg/L Zn^{2+} hingegen führt im Vergleich zu den Ansätzen nur mit Basismedium zu einer ca. dreifachen Erhöhung der Itaconsäurekonzentration. Die in der Abbildung 5-14 zu sehenden Schwankungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Tage sind darauf zurückzuführen, dass die auf die Ansätze ohne Zusatz am jeweiligen Tag bezogene, relative Itaconsäurekonzentration dargestellt ist. Es ergibt sich ein bedeutender Hinweis auf einen erhöhten Zinkbedarf von *Aspergillus terreus* NRRL1963 für die Itaconsäureproduktion. Ein ähnlicher Befund wird für andere *Aspergillus terreus* Stämme in der Literatur berichtet [Lockwood & Reeves 1945, Moyer & Coghill 1945, Batti & Schweiger 1963]

- **Zusammenhang von Manganbedarf, Biomassewachstum u Itaconsäureproduktion**

Einleitung:

Eine Mangansensitivität der Itaconsäureproduktion wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Aufgrund der Ähnlichkeiten zur Citronensäureherstellung in Bezug auf Mikroorganismus und Biosynthese lag es nahe, zu überprüfen, ob auch in diesem Falle eine Parallele festzustellen ist. Mangan ist ein für viele Mikroorganismen essentielles Spurenelement. Für einige filamentöse Pilze existieren schon seit längerer Zeit Hinweise darauf, dass der Manganspiegel im Medium die morphologische Erscheinungsform des Pilzes vom rein filamentösen bis zu pellettartigem Wachstum beeinflusst. Unmittelbar daran gekoppelt ist der Erfolg der Citronensäureproduktion bei *Aspergillus niger*, die mit hinreichender Produktivität nur von pellettartigem Mycel geleistet wird. Da diese nur bei sehr niedrigen Mangangehalten des Mediums von unter ca. 10 µg/L auftritt, findet man in der Literatur entsprechende Empfehlungen, den Mangangehalt auf niedrigem Niveau zu kontrollieren [Shu & Johnson 1948]. Die Abwesenheit bzw. sehr niedrige Konzentration von Mangan hat folgende Auswirkungen auf die Zellen von *A. niger* (Quellen in den folgenden Abschnitten):

1. Veränderung der Zusammensetzung von Zellwand und -membran
2. Veränderungen an Proteinsynthese und -abbau
3. Erhöhung des intrazellulären Ammoniumspiegels
4. Hemmung der NADP⁺-abhängigen Isocitratdehydrogenase im TCC
5. Eingriff in Nucleotidstoffwechsel

Die Veränderung der Zellwand bei Manganabwesenheit betrifft v. a. den Gehalt an aminogruppenhaltigen Kohlenhydraten wie Chitin, der auf Kosten der β -Glucane deutlich ansteigt [Kisser et al. 1980]. Auch die Zusammensetzung der Zellmembran verändert sich unter Mangandefizienz stark, indem der Anteil an Sterolen und Fettsäuren zugunsten von Phospholipiden gegenüber bei Mangananwesenheit bei wachsenden Zellen erniedrigt ist [Meixner et al. 1985], was zu einer größeren Permeabilität der Membran beiträgt [Legiša et al. 1992]. Außerdem wurde das Fehlen eines membranösen 39 kDa Proteins beobachtet [Auling 1994]. Alle diese Veränderungen gehen einher mit dem für eine optimale Citronensäureproduktion obligaten Wechsel der Morphologie hin zu kleinen, kompakten Pellets bzw. sind Voraussetzung dafür.

Unter Manganmangel ist ein erhöhter Abbau des gesamten Proteinpools von *A. niger* zu beobachten, während die Proteinbiosynthese genauso schnell wie bei Mangananwesenheit abläuft. Gleichwohl könnte die Abwesenheit von Mn^{2+} aber zu einer Veränderung der Ribosomen führen, da eine Zugabe von Cycloheximid, das die Peptidyl-Transferaseaktivität der 80 S-Ribosomen hemmt, dazu geeignet ist, den ertragsmindernden Effekt des Mangans auszugleichen [Ma et al. 1985, Kisser et al., 1980]. Daraus ist abzuleiten, dass eine negative Wirkung des Mangans auf die Säureproduktion nur bei aktiver Proteinsynthese auftreten kann.

Der unter Manganabwesenheit auftretende Anstieg des intrazellulären Ammoniumspiegels kann auf den erhöhten Proteinabbau zurückgeführt werden und ist nach Ansicht von Kubicek & Röhr (1986) maßgeblich an der Deregulation der Glykolyse beteiligt, indem die erhöhte Ammoniumkonzentration die Citrat-Sensibilität der Phosphofructokinase (E.C. 2.7.1.11) herabsetzt und somit die feed-back-Regulation abschaltet. Seit bekannt ist, dass die mitochondriale NADP⁺-abhängige Isocitratdehydrogenase (E.C. 1.1.1.42) vom Mangan abhängt, ist darüber spekuliert worden, ob eine Hemmung des TCC-Zyklus durch Manganmangel für die Anhäufung von Citronensäure eine Bedeutung hat. Da aber das gleiche Enzym sowohl in *Aspergillus niger* als auch in *Aspergillus terreus* ebenfalls mit Magnesiumionen reibungsfrei arbeitet [Kubicek & Röhr 1986, Winskill 1983] und die Magnesiumkonzentrationen der eingesetzten Medien im Vergleich zu deren Mangangehalten hoch sind, ist es unwahrscheinlich, dass ein Manganmangel an dieser Stelle des Stoffwechsels wesentlich eingreift, zumal für den entsprechenden Schritt im TCC auch eine NAD⁺-abhängige Isocitratdehydrogenase zur Verfügung steht [Kubicek & Röhr 1986]. Ein drastisches Absinken der DNA-Synthese unter den Bedingungen der Säureproduktion wird mit einer Hemmung der RNA-Reduktase in Verbindung gebracht [Hockertz et al. 1987, Auling 1994]. Das bedeutet einen Eingriff in den Nukleotidstoffwechsel.

Um den Einfluss verschiedener Manganzugaben zum Medium einerseits auf die Itaconsäureproduktion und andererseits auf die Morphologie von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 zu untersuchen, wurde der Pilz in vier, zuvor mit halbkonzentrierter Schwefelsäure gespülte Erlenmeyerkolben, in 100 mL B&S-Produktionsmedium bei pH 3,1 und 37°C auf dem Rotationsschüttler bebrütet. Die Hälfte der Kolben wurde zusätzlich mit 62 mg/L Phosphat und die andere Hälfte mit 31 mg/L Phosphat versetzt. Damit sollte eine eventuelle Wechselbeziehung zwischen Phosphat- und Manganspiegel untersucht werden, wie er von der Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* her bekannt ist [Kubicek & Röhr 1986].

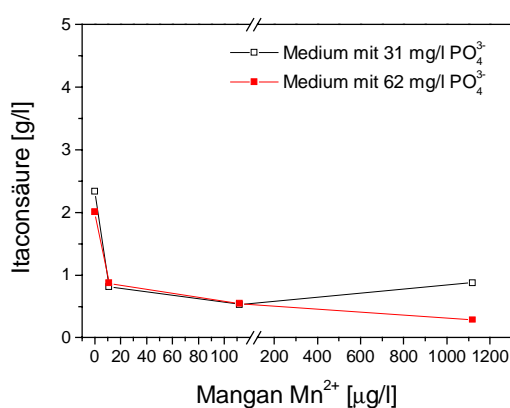


Abb. 5-15. Itaconsäurekonzentration nach 4d Inkubation in Abhängigkeit von zugesetzter Mangan- und Phosphatkonzentration

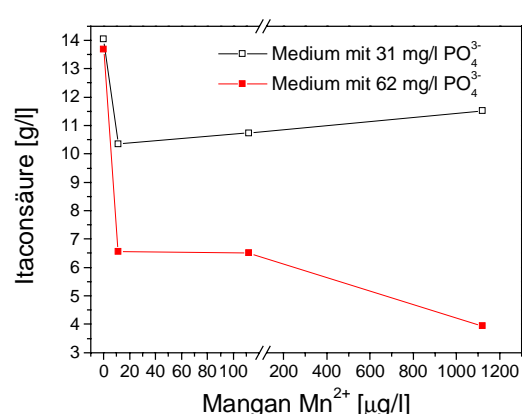


Abb. 5-16. Itaconsäurekonzentrationen nach 23 d Inkubation in Abhängigkeit von zugesetzter Mangan- und Phosphatkonzentration

Zu je zwei Kolben jeder Phosphatkonzentration wurden zum Schluss unterschiedliche Mengen von steril filtrierten Mangan(II)sulfatlösungen zugefügt, so dass im Medium Endkonzentrationen an Mangan von 1,12 mg/L, 0,112 mg/L bzw. 0,011 mg/L Mn^{2+} erreicht wurden. Für Ansätze ohne Manganzusatz wurde an Stelle einer Mangansulfatlösung steriles Wasser eingesetzt. Somit existierten je zwei Parallelansätze jeder Kombination zwischen den vier Mangankonzentrationen und den zwei Phosphatkonzentrationen (Abb. 5-15, 5-16).

Ergebnis:

Bereits die geringste zugesetzte Mangankonzentration von 11 $\mu\text{g/L}$ führte zu einer deutlichen Verminderung der Itaconsäureproduktion gegenüber den Ansätzen ohne Manganzusatz. Die Stärke der Verminderung scheint dabei von der Phosphatkonzentration abzuhängen, denn bei der höheren Phosphatkonzentration geht sie nach 23 Tagen um ca. 20 % zurück gegenüber einer Abnahme im Medium mit weniger Phosphat von rund 50 %. Auffällig ist die höhere Produktion der Ansätze bei 1,12 mg/L Mangan und der höheren Phosphatkonzentration von 62 mg/L PO_4^{3-} gegenüber den Ansätzen mit niedrigeren Mangankonzentrationen.

Wie insbesondere aus der Abbildung 5-16 deutlich zu ersehen ist, führt ein niedrigerer Phosphatgehalt des Mediums zu einer Abschwächung der schädlichen Mangankwirkung. Die hemmende Wirkung des Mangans hängt also offensichtlich auch von der Phosphatkonzentration ab.

Dieser Befund, einer vor den schädlichen Auswirkungen des Mangans schützenden Phosphatlimitierung, ist aus einem ähnlichen Versuch mit *A. niger* bei der Citronensäureherstellung bekannt [Kubicek & Röhr 1986]. Über die biochemischen Grundlagen für diese Beobachtungen liegen zur Zeit keine gesicherten Erkenntnisse vor. Es wird vermutet, dass das Phosphat auf Enzym- und nicht auf Genexpressionsebene wirkt [Kubicek & Röhr 1986].

Bereits nach 2 d Bebrütung ließen sich optisch einige Unterschiede in der Morphologie der Zellen erkennen (Abb. 5-17).

Die Ansätze mit der höchsten eingesetzten Mangankonzentration von 1,12 mg/L zeigten ein besonders fädiges Mycel von ca. 5 mm Länge (Abb. 5-19), während die Ansätze ohne Manganzusatz eine grob-pelletartige Wachstumsform (Abb. 5-18) aufwiesen. In den Ansätzen mit 11 $\mu\text{g/L}$ Mn^{2+} und 0,112 mg/L Mn^{2+} ließen sich sehr kleine, feine Hyphenstücke finden, die man als Mikropellets bezeichnen kann. Je größer die Mangankonzentration, desto kleiner waren die Pellets ausgeprägt. Die Pelletgröße nach zwei Tagen war mit unter 0,2 mm noch sehr gering. Sie nahm mit fortschreitender Zeit zu.

An der grundsätzlichen Erscheinungsform des Pilzes in den Ansätzen änderte sich auch bis zum 23. Bebrütungstag nichts. Zwischen den Versuchsreihen mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen konnten sich optisch in der Morphologie keine eindeutigen Unterschiede feststellen lassen.



Abb. 5-17. Unterschiedliche Mycelmorphologie bei verschiedenen Mangankonzentrationen; v.l.n.r.: 1,12 mg/L Mn^{2+} , 0,112 mg/L Mn^{2+} , 0,011 mg/L Mn^{2+} , 0 mg/L Mn^{2+} ; Phosphatkonzentration bei allen drei Kolben 31 mg/L PO_4^{3-}

In der Abbildung 5-18 ist ein Randstück eines sehr dichten, größeren Mycelpellet aus einem Ansatz ohne Manganzusatz dargestellt, während in der Abb. 5-19 das fädige, lockere Mycel aus einem Ansatz mit 1,12 mg/L Mn^{2+} -Zusatz zeigt.

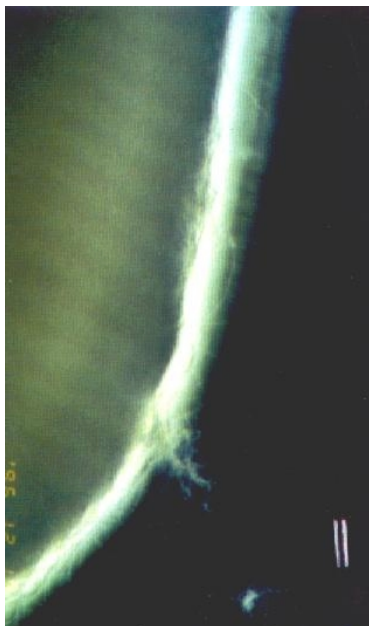


Abb. 5-18. Lichtmikrosk. Aufnahme vom Randstück eines dichten, größeren Mycelpellet im Ansatz ohne Manganzugabe nach 2d Bebrütung; Markierung = 100 μm



Abb. 5-19. Lichtmikrosk. Aufnahme vom fädigen, lockeren Mycel im Ansatz mit 1,12 mg/L Mn^{2+} nach 2d Bebrütung; Markierung = 100 μm

Die in den durchgeführten Versuchen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der Mangangehalt des Mediums einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie und die Itaconsäureproduktivität von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 besitzt. Dabei ist eine sehr niedrige Mangankonzentration von unter 10 µg/L für eine maximale Itaconsäureproduktion erforderlich. Dieses Resultat stimmt sehr gut mit den bei der Citronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* beschriebenen Phänomenen überein. So tritt die für eine hinreichende Citronensäureproduktion erforderliche Wachstumsform aus harten, kompakten Pellets nur bei sehr niedrigen Mn^{2+} -Konzentrationen von unter 22 µg/L Mn^{2+} auf [Kisser et al. 1980].

Andere Quellen geben für eine maximale Citronensäureproduktion noch niedrigere, erlaubte Konzentrationen von 3 µg/L Mn^{2+} [Kubicek & Röhr 1986] oder sogar 0,55 µg/L Mn^{2+} [Meixner et al. 1985] an. Shu & Johnson (1948) berichten über ein dem hier durchgeführten sehr ähnliches Experiment mit *Aspergillus niger*. Tendenziell sind dabei genau dieselben Phänomene bei *A. niger* wie bei *A. terreus* beobachtet worden. Dies betrifft zum einen die Empfindlichkeit gegenüber schon äußerst geringen Mangankonzentrationen, zum anderen aber auch die die Schädlichkeit des Mangans abschwächende Wirkung höherer Phosphatkonzentrationen.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine zellbiochemischen Untersuchungen an *A. terreus* NRRL 1963 vorgenommen werden konnten, muss bei der Erklärung der Mangan-Wirkung auf die Ergebnisse aus der Erforschung der Citronensäureproduktion mit *A. niger* zurückgegriffen werden. Dies erscheint durch die Ähnlichkeit beider Prozesse auch zulässig.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mangansensitivität der Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus*. Angesichts der Auswirkungen von Manganspuren im Bereich weniger µg/L beim Einsatz von Mediumskomponenten ist unbedingt auf die eventuell mit ihnen eingetragene Mangan-Kontamination zu achten. Dies gilt insbesondere für Eisen(II)salze, die selbst bei einer handelsüblichen Qualität „Pro analysi“ z.B. im Falle von Eisen(II)sulfat-heptahydrat noch bis zu 0,05% Mn^{2+} enthalten können, was bei einem Zusatz von 20 mg/L bereits zu einer kritischen Mangankonzentration von 10 µg/L Mn^{2+} führt. Unter diesem Aspekt sind Eisen(III)sulfate günstiger zu beurteilen, da sie in der vergleichbaren Qualitätsstufe eine Größenordnung weniger Mangan enthalten (z.B. max. 0,005 % Mn^{2+} im $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ der Qualität „pro analysi“).

Auch die Kohlenhydratquelle sollte ggf. einem Reinigungsschritt durch Kationenaustausch oder Hexacyanoferrat(II)-Fällung unterzogen werden.

Genauso bedarf die Qualität des in einem technischen Prozess verwendeten Wassers der Beachtung. So sind nach Anlage 4 der Trinkwasserverordnung (Anonymus 1986) regelmäßig bis zu 50 µg/L Mn^{2+} zugelassen, wobei kurzfristige Überschreitungen unberücksichtigt bleiben. Ein solches von der öffentlichen Versorgung zur Verfügung gestelltes Wasser müsste vor dem Einsatz in der Itaconsäureproduktion mit *A. terreus* durch Kationenaustausch aufgereinigt werden und würde zu einer Verteuerung des Verfahrens führen.

- **Zusammenhang von Eisenbedarf, Biomassewachstum und Itaconsäureproduktion**

Eisen-Ionen sind für viele Prozesse als Co-Faktoren notwendig. Batti & Schweiger wiesen 1963 auf einen hohen Einfluss von Eisen bei *Aspergillus terreus* NRRL 1960 hin.

Der Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (mit max. 0,005 % Mn^{2+}) auf die Itaconsäureproduktion und das Wachstum von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde mit drei verschiedenen $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ Konzentrationen überprüft.

Es stellte sich heraus, dass bei Zugabe geringer Eisenmengen eine erhebliche Steigerung der Itaconsäureproduktion erreicht wurde. Bei einer Zugabe von über 3 mg/L Fe^{3+} sank die Itaconsäureproduktion jedoch wieder ab.

Mit einer Konzentration von 1,5 mg/L Fe^{3+} konnten mit 120 g/L Saccharose als C-Quelle Itaconsäurekonzentrationen von 58 g/L erzielt werden (Abb. 5-20).

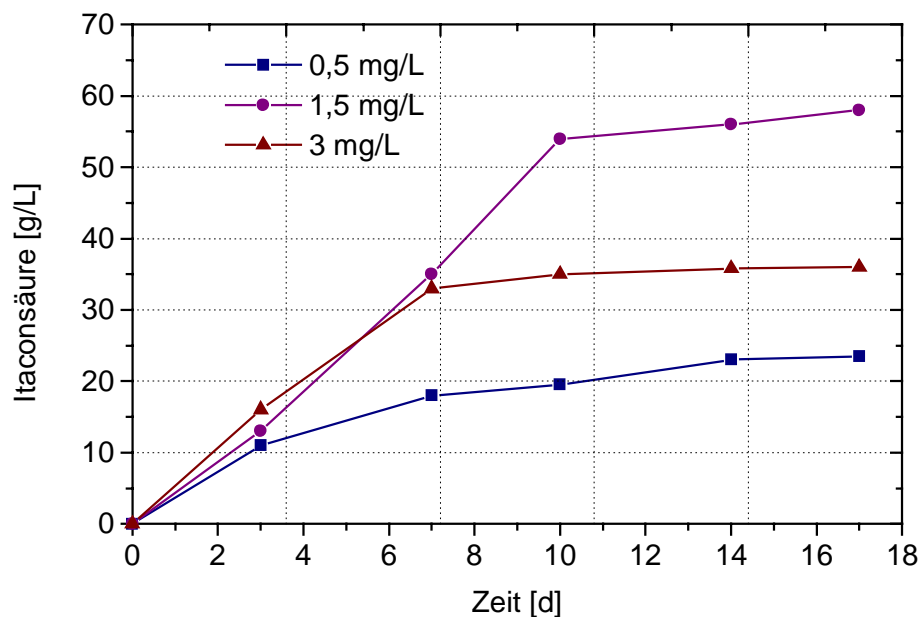


Abb. 5-20. Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen
	Medium:	100 mL B&S- Produktionsmedium
	Substrat:	120 g/L Saccharose
	Schüttlerfrequenz:	120 upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1, Einstellung mit 8M NaOH

5.4.6 Calcium / Zink / Kupfer - Verhältnis

Einleitung:

Gyamerah (1995a) fand für *Aspergillus terreus* NRRL 1960 eine Abhängigkeit der Itaconsäureproduktivität von der Wachstumsform, die ihrerseits durch die Zugabe von Gips respektive Calciumsulfat und den Spurenelementen Zink und Kupfer beeinflusst werden konnte. Auch für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde das optimale Zink / Kupfer / Calcium-Verhältnis ermittelt, indem der Pilz in mehreren Ansätzen bei hohen Calciumkonzentrationen mit verschiedenen Anfangskonzentrationen an $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ in 250 mL Erlenmeyerkolben inkubiert wurde. Die Abbildung 5-21 gibt die Ergebnisse wieder.

Ergebnis:

Aus der Abbildung 5-21 wird deutlich: die Anwesenheit von Kupfer und Zink hat einen starken Einfluss auf das Mycelwachstum und die Itaconsäurebildung. Mit zunehmender CuSO_4 -Konzentration (ab 0,005 g/L) steigt die Itaconsäureproduktion in Verbindung mit hohen Zinkkonzentrationen ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ über 0,008 g/L) sprunghaft an und das Wachstum von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 sinkt. Wie bereits im Rahmen dieser Arbeit ermittelt, führt ein erhöhter Zinkbedarf zur Erhöhung der Aktivität von *Aspergillus terreus* NRRL 1963. Aus einer Reihe von Arbeiten [Nubel & Ratajak 1962, Batti & Schweiger 1963, Kautola 1990] ist auch ein erhöhte Kupferbedarf von *Aspergillus terreus* bekannt. Bei hohen Kupfer- und Zinkkonzentrationen kommt es zu einem deutlichen Abfall des Biomassewachstums bei uneingeschränkter Itaconsäureproduktion. Jedoch ab $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ -Konzentrationen über 0,015 g/L kam es wiederum zu einer Verringerung der Itaconsäurebildung

Das optimale $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ / $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -Verhältnis in Verbindung mit hohen Calciumkonzentrationen (ca. 10 g/L) liegt bei 0,015 g/L / 0,008 g/L. In diesem Bereich wurde eine kleine feste Pelletbildung auffällig (dicker Pfeil in der Abbildung 5-21). Diese charakteristische kleine feste Pelletbildung wird durch hohe Kupfer-, Calcium- und Zink-Konzentrationen bewirkt. Der wichtigste Faktor für die charakteristische Pelletbildung ist jedoch der verhältnismäßig hohe Anteil an Zink und Calcium. Versuche, die allein mit höheren Kupfer- und Calciumkonzentrationen durchgeführt wurden, ergaben diese charakteristische kleine feste Pelletbildung nicht.

Die Ausgewogenheit zwischen einerseits hohen Konzentrationen am Erdalkalimetall Calcium und andererseits den Spurenelementen Zink und Kupfer führte zu einer Wachstumsmorphologie des Pilzes, die einerseits als Voraussetzung für hohe Aktivitäten und Erträge ganz wesentlich ist, und andererseits zu einem geringeren Wachstum der Zellen führte.

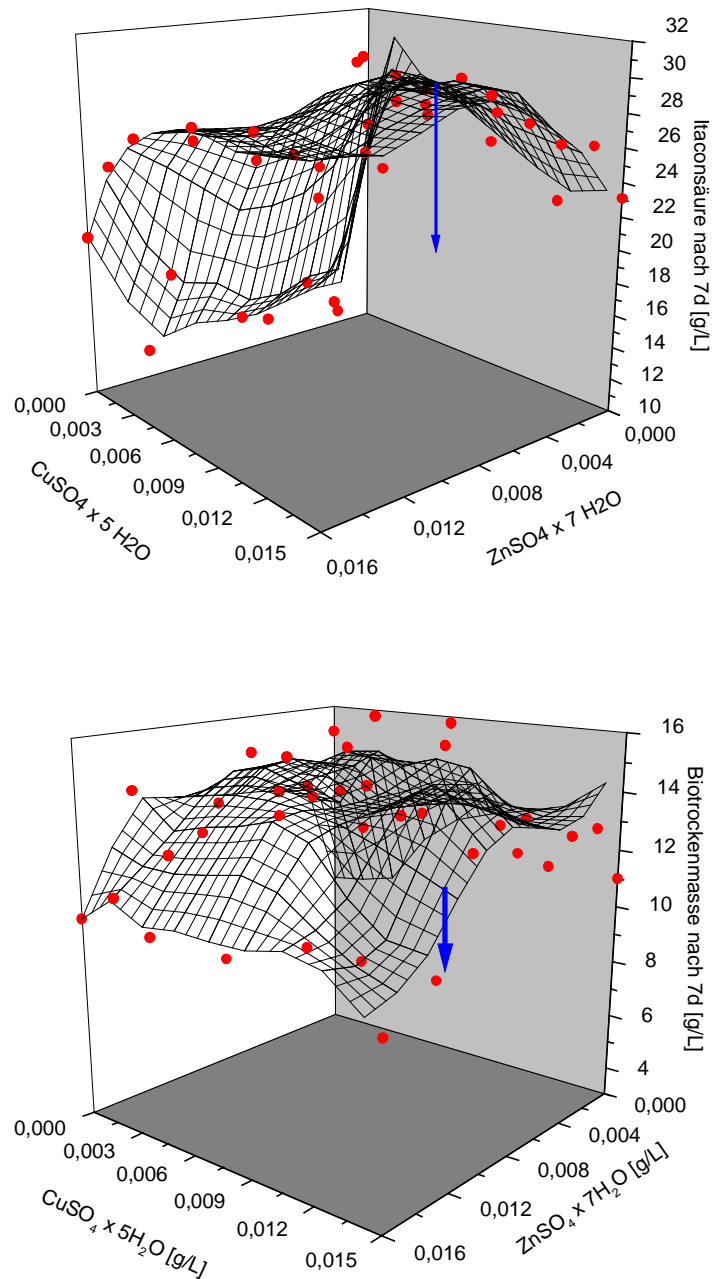


Abb. 5-21. Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (beim dicken Pfeil trat kleine feste Pelletbildung auf)

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Inokulum:	10 %, BTM
	Substrat:	96 g/L Glucose
	Schüttelfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen die beiden im Rahmen dieser Arbeit aufgetretenen Wachstumsformen (s. Abb. 5-22, 5-23).

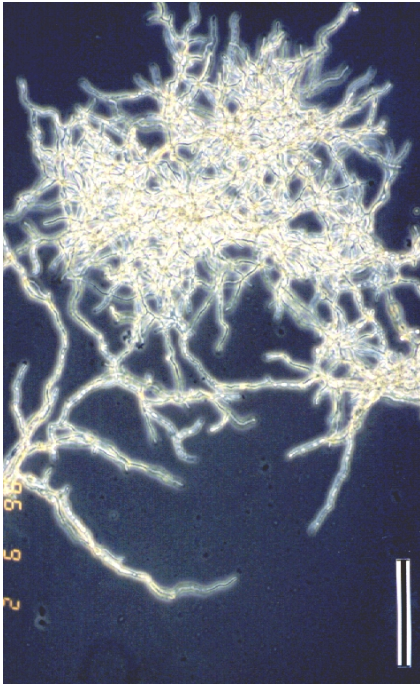


Abb. 5-22. *Freies Mycel aus dem Ansatz mit 0,3 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit optimalem Zn/Cu-Verhältnis; Markierung entspricht 100 μm*

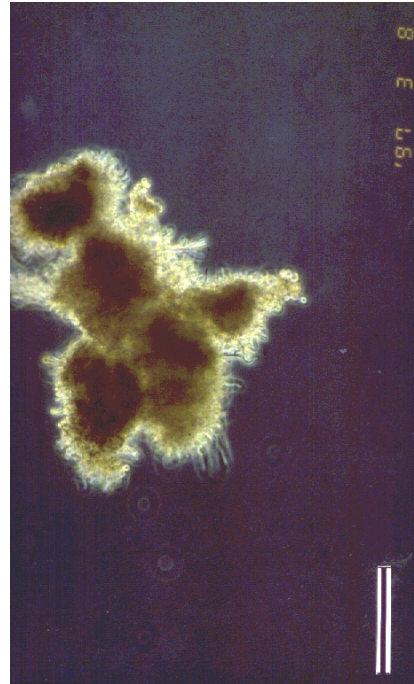


Abb. 5-23. *Freies Mycel aus dem Ansatz mit 10 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit optimalem Zn/Cu-Verhältnis; Markierung entspricht 100 μm*

5.4.7 Einfluss der Substratkonzentration

Grundlegende Kenntnisse zur Abhängigkeit der Itaconsäurebildung von der Substratkonzentration sind für die Auslegung des Prozesses der Itaconsäurefermentation von entscheidender Bedeutung. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in 250 mL Schüttelkolben mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen inkubiert. Es wurden Glucosekonzentrationen zwischen 40 und 200 g/L eingesetzt.

Bei allen Versuchen wurde der pH-Wert täglich überprüft und nach Absinken auf einen pH-Wert unter 2 auf einen pH-Wert von 2 mit 4 M NaOH nachgestellt, dies trat jedoch auch bei den höheren Glucose-Anfangskonzentrationen nur in geringem Umfang auf. Freie Zellen von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 weisen ein Optimum der Produktion bei 80-160 g/L Glucose auf und zeigen einen starken Einbruch bei Glucosekonzentrationen von über 200 g/L (s. Abb. 5-24). Es liegt vermutlich eine Substrathemmung vor. Substrathemmung kann verfahrenstechnisch umgangen werden, indem das Substrat beispielsweise portionsweise zugegeben wird (Fed-Batch).

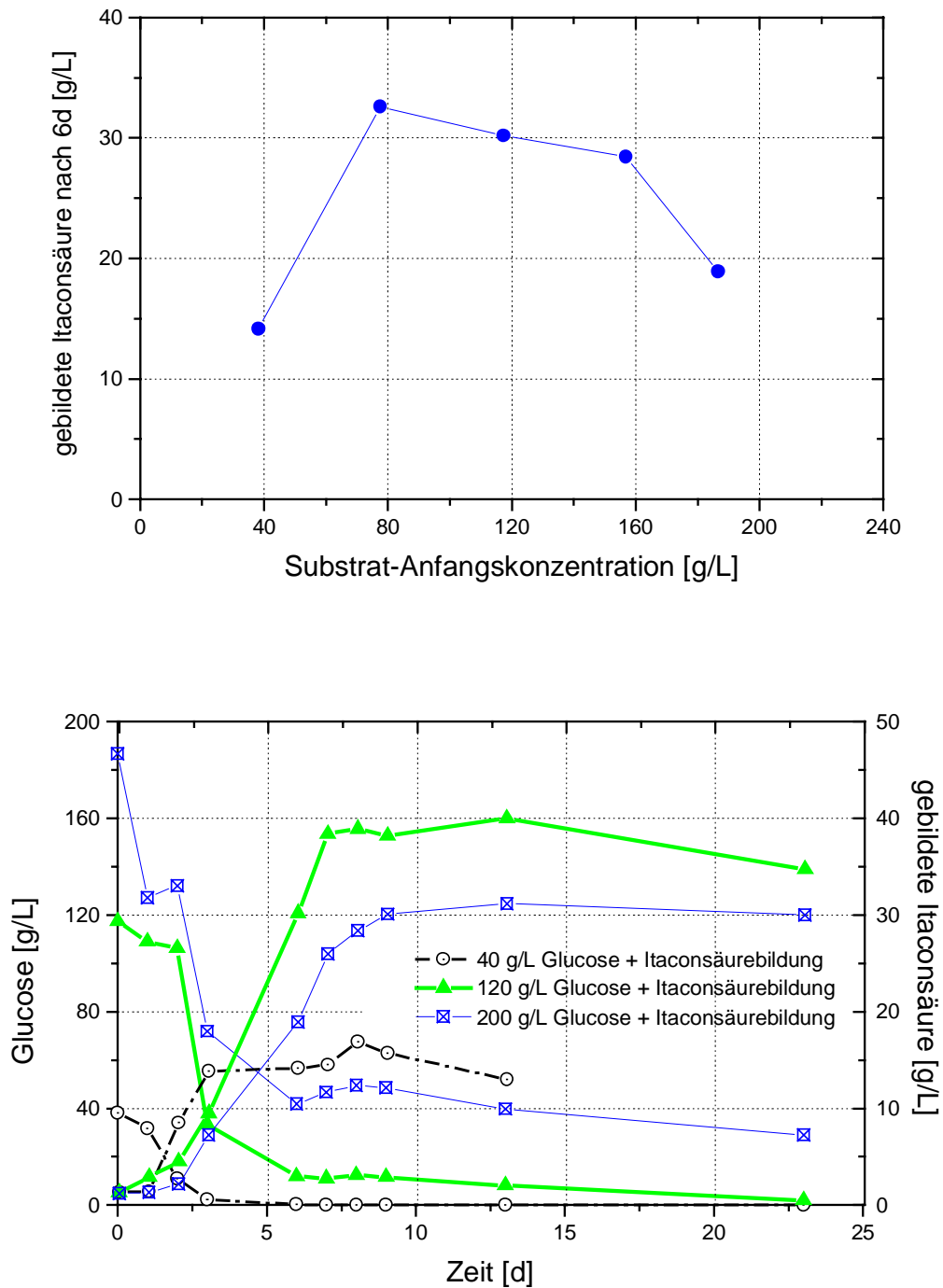


Abb. 5-24. Einfluss der Substratkonzentration auf die Itaconsäureproduktion

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Animpfmenge:	10 % BFM
	Substrat:	40-200 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur:	37°C
	pH-Wert:	3.1

5.4.8 Einfluss der Produktkonzentration

Um den Einfluss der Produktkonzentration an Itaconsäure auf den Itaconsäurebildungsprozess zu bestimmen, wurden zu Beginn von Schüttelkolbenversuchen extern verschiedene Konzentrationen an Itaconsäure zugesetzt. Die Differenz aus der Gesamt-Itaconsäurekonzentration am Ende der Versuche wurde von dieser eingangs diesem Versuch zugesetzten Menge an Itaconsäure abgezogen und in der Abbildung 5-25 dargestellt.

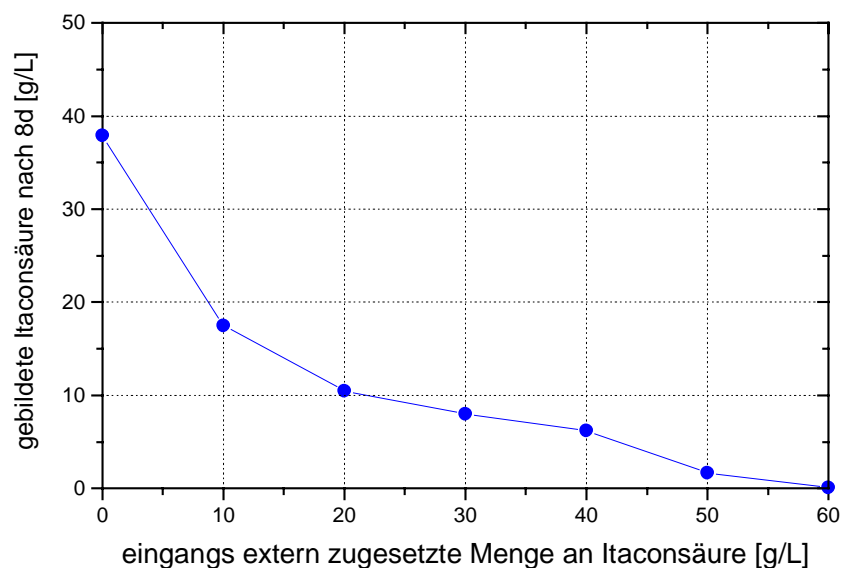


Abb. 5-25. Abhängigkeit der Itaconsäurebildung von einer zusätzlich zugesetzten Menge an Itaconsäure

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen
	Medium:	100 mL B&S-Produktionsmedium
	Animpfmenge:	10 % BFM
	Substrat:	120 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur:	37°C
	pH-Wert:	3.1

Aus der Abbildung 5-25 geht deutlich hervor, je höher die extern zugesetzte Menge an Itaconsäure war, je schlechter verlief die Itaconsäureproduktion. Bereits bei extern zugesetzten Initial-Itaconsäurekonzentrationen von 10 g/L kann ein deutlicher Abfall der Itaconsäurebildung beobachtet werden. Bei einer Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 muss nach diesen Ergebnissen mit einer Produkthemmung gerechnet werden.

Zum Abbau der Itaconsäure durch den Pilz selbst stellten Lockwood & Reeves (1945) nach 12 Tagen bei einem Versuch mit initial 55,6 g/L Itaconsäure im Medium eine 90 prozentige Verstoffwechselung fest, die aber nicht bei niedrigen pH-Werten (unter 3,5) stattfand. Da alle Versuche bei pH-Werten von 3,1 durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Verstoffwechselung der Itaconsäure durch den Pilz selbst kam.

5.4.9 Einfluss von Temperatur, pH-Wert, Animpfmenge und Scherbeanspruchung auf die Itaconsäureproduktion

Mit dem Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurden die in der Tabelle 5-6 aufgeführten Parameter auf ihren Einfluss auf die Itaconsäureproduktion in Schüttelkolbenversuchen getestet.

Alle Versuche wurden unter definierten Versuchsbedingungen durchgeführt. Neben der Veränderung des jeweiligen Parameters wurde *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in einem Animpfverhältnis von 1:10 im 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen in 100 mL Standard-Produktionsmedium bei 37°C, einem pH-Wert von 3,1 und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 Upm im Dunkeln bebrütet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 folgende Bedingungen am günstigsten sind.

Tab. 5-6 Einfluss verschiedener Parameter auf die Itaconsäureproduktion

Einflussfaktoren	Bereich	Ergebnis
Temperatur	20-40°C	<ul style="list-style-type: none"> maximale Itaconsäureproduktion bei 37°C
Animpfmenge	1:10 - 5:10	<ul style="list-style-type: none"> günstiges Animpfverhältnis 1:10
pH-Wert	Anfangs-pH-Werte 1-4	<ul style="list-style-type: none"> maximale Itaconsäureproduktion bei Anfangs-pH 3,1 bei pH-Werten unter 3 abnehmende Pelletbildung in pH-ungeregelten Ansätzen sinkt der pH-Wert von 3,1 auf ca. pH 2 ab eine Pufferung mit einem Glycin /HCL-Puffer (pH 3) erbringt keine besseren Ergebnisse, als ungepufferte Systeme
Scherbeanspruchung	100-200 Upm	<ul style="list-style-type: none"> optimale Schüttelfrequenz 120 Upm, bei Werten über 150 Upm Abnahme der Aktivität der Zellen

5.5 Itaconsäureproduktion mit freien Zellen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963

Am Ende der Optimierungsversuche zur Untersuchung des Bedarfs an Spurenelementen und mineralischen Bestandteilen ergab sich das Standard-Produktionsmedium (Tab. 4-8).

Für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 sollten sich mit dem Standard-Produktionsmediums und bei Verwendung optimaler Prozessparameter (Tab. 5-6) ideale Produktionsbedingungen einstellen. Da das Vorliegen einer Produkthemmung bekannt ist, ist für den Itaconsäureproduktionsprozess ein Batch- bzw. Repeated-Batch-Betrieb angezeigt und getestet worden.

Im **Batch-Betrieb** wurde der Schüttelkolben mit Medium gefüllt, angeimpft und nach vollständigem Umsatz des Substrates entleert. Das Ergebnis gibt die Abbildung 5-26 wieder.

Mit Standard-Produktionsmedium wurden im 250 mL-Erlenmeyerkolben bei stark eingeschränktem Biomassewachstum nach 8 d mit 80 g/L Glucose 49 g/L Itaconsäure gebildet.

Dies waren ca. 10 g/L Itaconsäure mehr als mit dem bisher verwendeten Medium nach Batti & Schweiger (B&S-Produktionsmedium). Die Produktivität in diesem unregelmelten Versuchsansatz betrug 0,4 g_{Itac}/Lxh. Die Ausbeute betrug 86,15 [Mol %].

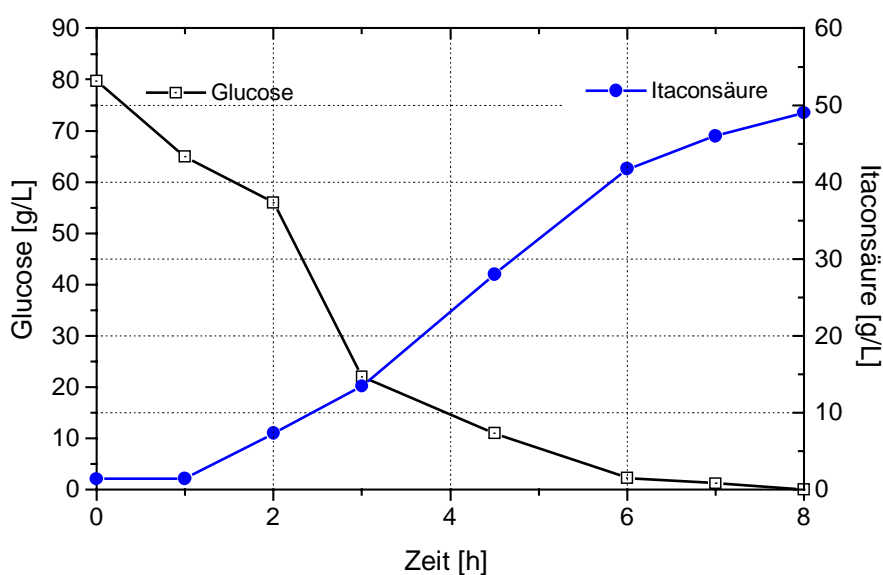


Abb. 5-26 Itaconsäureproduktion im Batch-Betrieb

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Animpfmenge:	10 % BFM mit 2 g/L BTM
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Zum Vergleich erreichte Gyamerah (1995a) ebenfalls in Schüttelkolbenkultur mit *Aspergillus terreus* NRRL 1960 mit 100 g/L Saccharose eine Produktivität von 0,29 g_{Itac}/Lxh. Die meisten Arbeiten in der Literatur berichteten von Werten zwischen 0,3 - 0,6 g_{Itac}/Lxh. Eine Ausnahme macht das Patent von Nubel & Ratajak (1962) mit einer angegebenen Produktivität für freie Zellen von 0,98 g_{Itac}/Lxh.

Tab. 5-7. Vor- und Nachteile eines Batch-Betriebes für die Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • mittlere bis niedrige Produktkonzentration (kaum Produkthemmung) • einfaches Verfahren • geringer apparativer u. personeller Aufwand 	<ul style="list-style-type: none"> • mittlere bis hohe Substratkonzentration (Substrathemmung) • hoher Anteil inaktiver und toter Biomasse

Im Batch-Verfahren ist eine möglichst hohe Substratkonzentration wünschenswert, um bei gegebener Ausbeute eine maximal mögliche Produktkonzentration zu erzielen. Anfänglich hohe Substratkonzentrationen sind jedoch für den Itaconsäureproduktionsprozess wegen den dadurch verursachten Hemmungen wiederum von Nachteil.

Da eine kontinuierliche Betriebsweise aufgrund der Produkthemmung nicht in Frage kommt, wurden Versuche im **Repeated-Batch-Betrieb** durchgeführt. Hierzu wurde ein Schüttelkolben mit Medium gefüllt, angeimpft und nach Umsatz des Substrates entleert. Die Biomasse wurde anschließend jeweils abzentrifugiert (s. Kap. 4.2.1) und zur Beimpfung eines neuen Batches verwendet.

Beim ersten Repeated-Batch-Ansatz war bereits nach 6 Tagen das Substrat Glucose von 80 g/L auf 2 g/L abgebaut. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden aus diesem Grund auch die weiteren Repeated-Batch-Ansätze nach 6 Tagen abgebrochen. Während im ersten Ansatz nach 6 Tagen noch 41,6 g/L Itaconsäure aus ca. 80 g/L Glucose gebildet wurde, wurden in drei folgenden Ansätzen jedoch nur noch ca. 30 g/L Itaconsäure in 6 Tagen produziert. Die Ursache für die immer geringer werdene Itaconsäureproduktion ist vermutlich in dem für das Pilzmycel nach jedem Ansatz, aus physiologischer Sicht, ungünstigem Zentrifugievorgang begründet. In zukünftigen Arbeiten sollten hier schonendere Verfahren getestet werden.

6. Itaconsäureproduktion mit immobilisierten Zellen

6.1 Einleitung

Filamentöse Pilze sind, wie aus den letzten Kapiteln ersichtlich, schwer zu handhaben. Durch Immobilisierung kann ein besseres Biomasse-Handling und eine bessere Langzeittabilität erreicht werden. Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich aus diesem Grund intensiv dem Thema der Immobilisierungsmöglichkeiten von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 mit dem Ziel einer Itaconsäurefermentation mit hohen Produktivitäten.

Die Verfahren der Immobilisierung von Zellen sind den Kategorien Quervernetzung, Matrixeinschluss, Trägerbindung und Membrantrennung zuzuordnen. Bis auf die Membrantrennung in Form von Mikroverkapselung sind alle genannten Immobilisierungsmethoden bei der Itaconsäureherstellung mit *Aspergillus terreus* zumindest versuchsweise zur Anwendung gelangt. Die Zellrückhaltung mittels Filtermembran im Reaktor scheiterte jedoch am Bewuchs der Membranen [Park et al. 1994].

Zu den Verfahren der Quervernetzung zu rechnen ist die Flockulation des Mycel mit Hilfe von Polyelektrolyten. Kokofuta et al. (1988) setzte dazu das Polyanion Kalium (polyvinylalkohol) sulfat und die polykationische Verbindung Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) ein (Tab. 6-1). Da filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus* ohnehin zur Bildung von Mycel-pellets neigen, bringt eine derartige Immobilisierung allerdings kaum Vorteile, da dieselben Nachteile wie bei nativen Pellets auftreten, wie Diffusionshemmung und nachfolgendes Absterben von Biomasse innerhalb der Pellets bzw. Immobilisate.

Als Träger von Adsorptionsimmobilisaten wurden durch Kautola et al. (1991) und Vassilev et al. (1992) Polyurethanschaum-Würfel sowie der auf Kieselsäure basierende Werkstoff Celite[®] eingesetzt. Scheiben aus Edelstahldrahtgeflecht als Adsorptionsmaterial nutzten Ju & Wang (1986) in ihrem Scheibenreaktor. Neben der Desorption von Biomasse besteht ein weiterer großer Nachteil der Adsorptionsimmobilisate darin, dass sich nicht nur der gewünschte Mikroorganismus, sondern auch Kontaminanten auf den Trägermaterialien festsetzen können und somit eine sterile Betriebsweise erheblich schwieriger zu verwirklichen ist.

Unter diesem Gesichtspunkt unempfindlicher sind Einschlussimmobilisate. Die aus den Algenprodukten hergestellten Alginat- und Agar-Gele besitzen eine hervorragende biologische Verträglichkeit, genügen häufig aber nicht den Anforderungen an die mechanische und chemische Belastbarkeit. Zudem bilden eine Reihe von Mikroorganismen Enzyme, die diese Biopolymere zu spalten vermögen. Bei Immobilisaten aus Poly(acrylamid)-Gelen, wie sie von Horitsu et al. (1983) eingesetzt wurden, ist es genau umgekehrt. Sie sind zwar

chemisch und mechanisch stabil, es kommt aber wegen der Toxizität der Monomere während des Polymerisationsprozesses zu erheblichen Aktivitätsverlusten der Zellen, so dass eine verhältnismäßig kurze Halbwertszeit von 10 Tagen beobachtet wurde [Horitsu et al. 1983].

Am Ende der Tabelle 6-1 wurden auch die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse mit dem Einschlussimmobilisat LentiKats® und mit dem Adsorptionsimmobilisat Siliconperlen eingefügt.

Erläuterungen zu den Spalten der Tabelle 6-1:

Immobilisierung	frei	keine Immobilisierung
	PAG	Polyacrylamidgel
	StNetz	Stahlnetz-Scheiben
	PUR-S	Polyurethan-Schaum-Würfel
	Flock	Flockulation von Mycel mit Polyelektrolyten
	Celite	Celite® R-626
	Agar:	Agar-Würfel
Reaktortyp	STR	Rührkesselreaktor
	PBR	Festbettreaktor
	SK	Schüttelkolben
	PDR	Scheibenreaktor
	BS	Blasensäule
Betrieb	konti	kontinuierlich
	rep-b	Repeated-Batch-Betriebsweise
Produktionsmedium		Zusammensetzung des Mediums, Angaben in g/L
	Glc	Glucose
	Xyl	Xylose
	CSL	Maisquellwasser
C _{itac}		Itaconsäurekonzentration im Ablauf(konti) bzw. im Durchschnitt aller Zyklen (Repeated-Batch)
	k.A.	keine Angaben
Dauer		Dauer der stabilen Produktion (konti) bzw. Anzahl und Dauer der Zyklen bei Repeated-Batch-Ansätzen

Tab. 6-1. Übersicht über veröffentlichte Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* in kontinuierlicher oder Repeated-Batch-Betriebsweise mit immobilisierten Zellen (Erläuterungen, s. 86)

Autor	Stamm	Immobilisierung	Be-trieb	Reaktor V _R [mL]	T [°C]	pH	Produktionsmedium [g/L]	Produktivität [g/Lxh]	spez.Aktivität [mg _{Itac} /g _{Kat} xh]	C(Itac) [g/L]	Dauer [d]
Horitsu et al. 1983	G026	40g PAG	konti	PBR 100 mL	35	2,5	Glc:60 CSL:1 (NH ₄)NO ₃ :3 MgSO ₄ :7H ₂ O:2	0,6	2,78	15	15
Kautola et al. 1985	NRRL1960	6,5g Alginat	rep-b	SK 100 mL	36	3,1	Xyl:60 (NH ₄) ₂ NO ₃ :3 MgSO ₄ :7H ₂ O:0,8 CuSO ₄ :0,004	0,06	14	7	17
Kautola et al. 1985	NRRL1960	gepackte Celite	konti	PBR 16x70 mm	36	3,1	Glc:60 NH ₄ NO ₃ :3 MgSO ₄ :7H ₂ O:0,8 CuSO ₄ :0,004	1,2	18,46	11	24
Horitsu et al. 1985	G026	30g PAG	konti	BS 100 mL	33	2,2	Glc:60 NH ₄ NO ₃ :3 MgSO ₄ :7H ₂ O:0,5	0,83	k.A.	20,9	30
Ju & Wang 1986	NRRL1960	StNetz	konti	PDR k.A.	36	3	Glc:50 (NH ₄) ₂ SO ₄ :3,3MgSO ₄ :7H ₂ O:0,8 IA:1 KH ₂ PO ₄ :0,088 CuSO ₄ :0,004	0,73	k.A.	18,2	30
Kokofuta et al. 1988	K 26	Flock	rep-b	SK k.A.	30	3,8	Glc:80 NH ₄ NO ₃ :3 MgSO ₄ :7H ₂ O:2CSL:2	0,33	k.A.	27	5X3,7
Kautola et al. 1990	TKK200-5-3	0,95g PUR-S	konti	PBR 95 mL	36	3	Glc:90 NH ₄ NO ₃ :2,5 MgSO ₄ :0,95 CuSO ₄ :0,04	0,14	k.A.	26	135
Kautola et al. 1991	TKK200-5-1	0,5g PUR-S	rep-b	STR 100 mL	37	3,1	Glc:150 NH ₄ NO ₃ :4 MgSO ₄ :7H ₂ O:3 CaCl ₂ :2H ₂ O:6 CuSO ₄ :0,004	0,15	k.A.	51	4X14
Vassilev et al. 1992	TKK200-5-1	0,95g PUR-S	konti	PBR 95 mL	36	3	Glc:90 NH ₄ NO ₃ :2,5 MgSO ₄ :0,95 CuSO ₄ :0,004	0,15	k.A.	26	112
Welter 1999	NRRL 1963	0,2g Siliconperlen	rep.b	SK 100 mL	37	3,1	Glucose 80, NH ₄ NO ₃ :2 MgSO ₄ :7H ₂ O:1, CuSO ₄ :5H ₂ O 0,015, ZnSO ₄ :7H ₂ O: 0,008, KH ₂ PO ₄ : 0,08, CaCl ₂ :2H ₂ O:10, Fe(III)SO ₄ x 5 H ₂ O: 1,5 ppm	0,08	40	20	4x8
Welter 1999	NRRL 1963	0,2g LentiKats®	rep.b	SK 100 mL	37	3,1	Glucose 80, NH ₄ NO ₃ :2 MgSO ₄ :7H ₂ O:1, CuSO ₄ :5H ₂ O 0,015, ZnSO ₄ :7H ₂ O: 0,008, KH ₂ PO ₄ : 0,08, CaCl ₂ :2H ₂ O:10, Fe(III)SO ₄ x 5 H ₂ O: 1,5 ppm	0,3	100	32	2x7

6.2 Immobilisierung durch Adsorption

Die Immobilisierung von *Aspergillus terreus* durch Adsorption oder Aufwuchs ist zur Zeit die in der Literatur vorherrschende Immobilisierungsmethode für die Itaconsäureproduktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei poröse Aufwuchsmaterialien in Form von Siliconträgern und Sinterglas-Kugeln (Schott SIRAN®) für die Eignung zur Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 getestet. Die Trägermaterialien wurden, wie im Kapitel 4.3.1 beschrieben, vorbereitet und bei täglicher Probenahme zur Bestimmung der Itaconsäureproduktion so lange inkubiert, bis sich konstante Itaconsäureproduktivitäten einstellten. Am Anfang standen Erfahrungen mit der Anzucht und dem Auswachsen der Zellen in und aus den Immobilisaten im Mittelpunkt der Arbeit. Im Anschluss wurden die Immobilisate bezüglich verschiedener Parameter in Schüttelkolbenversuchen charakterisiert.

Alle Versuche wurden unter definierten Versuchsbedingungen durchgeführt. In 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen wurden die Immobilisate in 100 mL Standard-Produktions-medium bei 37°C, einem pH-Wert von 3,1 und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 Upm im Dunkeln bebrütet. Am Ende aller Versuche erfolgte eine Substrat-, Produkt-, und Biomassebestimmung.

6.2.1 Itaconsäureproduktion mit Siliconträgern

Silicone verfügen im Vergleich zu anderen Kunststoffen über ungewöhnlich hohe Gaslöslichkeiten und Permeabilitäten [Rogers, C.E. 1985]. Die Einschlussimmobilisierung von Mikroorganismen hat den Nachteil, dass ein weiterer Transportschritt für Edukte und Produkte entsteht, Sauerstoff kann dabei zum limitierenden Faktor werden. Die Lösung dieses Problems kann in der Verwendung eines Trägermaterials mit guten Sauerstofftransporteigenschaften liegen. Silicon ist ein Material dessen Sauerstofflöslichkeit sehr groß ist. So ist der Permeationskoeffizient (Produkt aus Löslichkeit und Diffusionskoeffizient) um ein Vielfaches höher als bei Hydrogelen. Das bedeutet, dass der Sauerstofffluss zu den Mikroorganismen in Siliconträgern größer ist als in herkömmlichen Materialien [Bettin, 1997]. Silicon erscheint aus diesen Gründen besonders geeignet für aerobe Prozesse wie z.B. den der Itaconsäureproduktion.

Bei den in den nachfolgenden Versuchen eingesetzten Siliconträgern handelt es sich um Aufwuchs-Immobilisate mit einem Durchmesser von 1,8-2 mm. Die Porenverteilung des verwendeten Materials ist derart, dass 80 % der Poren eine Größe zwischen 100 bis 200 µm besitzen, 20 % der Poren sind kleiner als 100 µm [Bettin, Diss. in Vorbereitung].

Die Porengrößen zwischen 100-200 μm sind für die Ansiedlung der Pilzsporen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in den Immobilisaten aufgrund der Sporengröße des Pilzes geeignet.

Nachteil der relativ einfachen Adsorptionsimmobilisierung ist, dass die Adsorptionskräfte zwischen Zellen und Träger relativ gering sind, so dass es schnell zur Auswaschung der Zellen kommen kann. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag aus diesem Grund in der Beurteilung von Wachstum und Auswaschen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 mit diesem Trägermaterial und deren Einfluss auf die Itaconsäurebildung.

Vor dem Einsatz der Immobilisate zur Itaconsäureproduktion im Standard-Produktionsmedium (s. Tab. 4-8) wurde das Trägermaterial zur Anzucht mit 100 mL Wachstumsmedium (s. Tab. 4-5) versetzt, welches bereits eine definierte Menge Pilzsporen (10^3 - 10^4 Sporen/mL) enthielt und bei 37°C und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 Upm 5 d im Dunkeln inkubiert. Entscheidend für das Aufwuchsmaterial zur Adsorption von Pilzen ist ein hohes inneres Porenvolumen. Über Kapillarkräfte werden die Sporen in die Poren der Perlen hineingezogen [Wainwright, 1992]. Während der 5-tägigen Anwuchsphase wurden die Sporen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 infolge Kapillarwirkung in die Poren der Siliconperlen hineingezogen und dehnten sich im Laufe der Zeit infolge des sich auskeimenden Pilzmycels im Siliconmaterial weiter aus. Ein Schnitt der Siliconperlen nach 4 d Inkubation im Wachstumsmedium zeigte, dass sich das Pilzmycel hauptsächlich im oberen Randbereich des Trägermaterials ausdehnte, obwohl der Sauerstofffluss zu den Mikroorganismen im Siliconträger aufgrund hoher Gaslöslichkeiten und Permeabilitäten des Materials auch in den inneren Regionen der Siliconträger optimal sein sollte. In der Abbildung 6-1 sind bewachsene Siliconträger nach 5 Tagen Wachstumsmedium dargestellt (der Pilz wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt, hell = Siliconmaterial, dunkel = Pilzmycel).

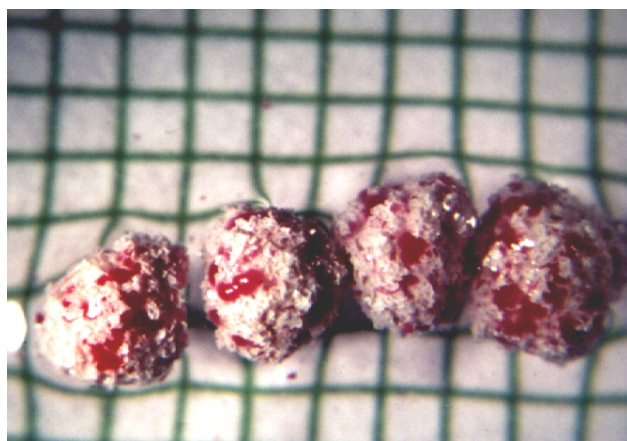


Abb. 6-1. Mycelbewuchs im Siliconträger nach 5 d Anwuchsphase im Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1mm)

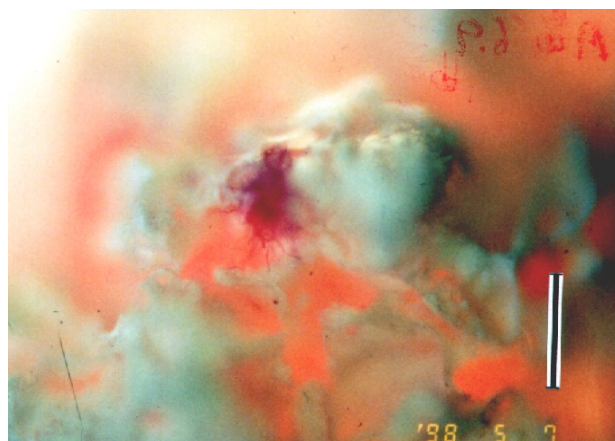


Abb. 6-2. Adsorbierte Pilzkolonie (Pfeil) nach 5 d Anwuchsphase (Markierung entspricht 100 μm)

Nach der Anwuchsphase im Wachstumsmedium wurden die Siliconträger abgeseibt und in ein Standard-Produktionsmedium übertragen, in welchem das Wachstum weitgehend eingeschränkt und die Itaconsäureproduktion aktiviert wurde. Im Abstand von 14 d wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Während der durchgeführten Repeated-Batch-Versuche wurde das Medium immer wieder durch aus den Immobilisaten ausgewaschene Zellen des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 trüb. Um ein Maß für die Menge der ausgewaschenen Zellen und deren Anteil am Gesamt-Itaconsäureproduktionsprozess zu bekommen, wurde die Menge der ausgewaschenen Zellen über eine Messung der optischen Dichte bestimmt. Über einen Vergleichsversuch mit freien Zellen konnte so auf den Anteil der gebildeten Itaconsäure dieser freien Zellen geschlossen werden (s. Abb. 6-3). Die Bestimmung der optischen Dichte (Grobverfahren) wurde mit einer gleichzeitig durchgeführten BTM Bestimmung (durch Filtration und Trocknung) verglichen. Beide Methoden ergaben adäquate Ergebnisse. Aus praktischen Gründen wurde in den folgenden Repeated-Batch-Versuchen zur Bestimmung der ausgewaschenen Biomasse nur noch eine OD-Messung vorgenommen.

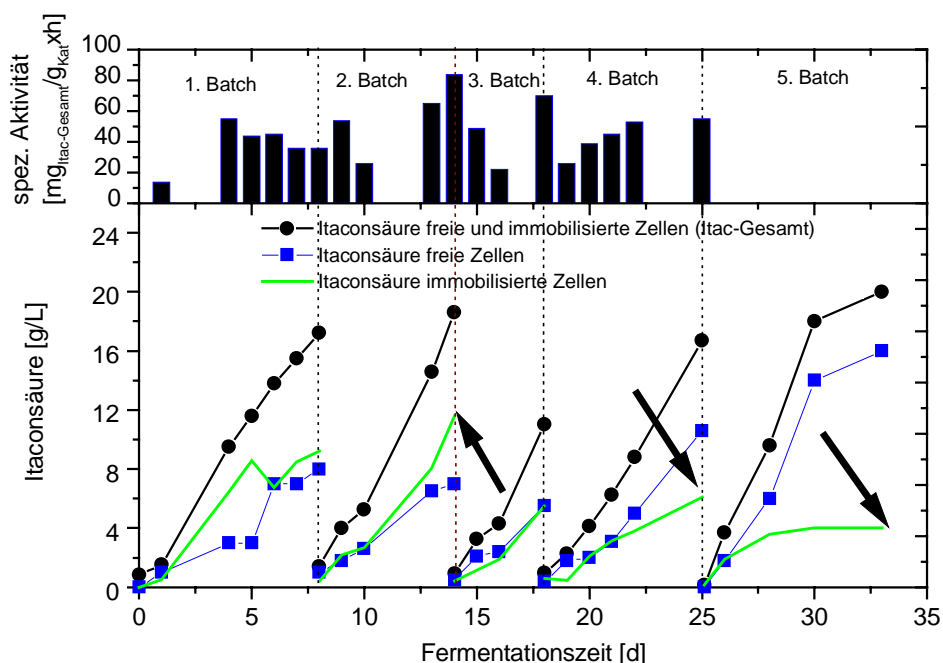


Abb. 6-3. Itaconsäureproduktion mit Siliconperlen

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Beladung:	2 g KFM/L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert	37°C, 3.1

Im Verlauf der Repeated-Batch-Versuche wurde ab dem 3. Batch-Ansatz festgestellt, dass die Itaconsäureproduktion von den in den Immobilisaten adsorbierten Zellen immer geringer wurde (Pfeile in der Abb. 6-3).

Dies war nur möglich, weil der Pilz trotz wachstumslimitierenden Medium auf der Oberfläche der Siliconperlen in einer immer stärker werdenden Schicht wuchs und durch Desorption und Abrieb die ständig neu gebildeten Zellen von der Trägeroberfläche abgewaschen wurden, welche im Endeffekt als frei im Medium vorliegende Zellen zunehmend den Hauptanteil der Gesamt-Itaconsäureproduktion ausmachten (s. Abb. 6-3). Wie eingangs beschrieben, fand bereits während der Wachstumsphase im Wachstumsmedium vor allem ein Bewuchs der Siliconperlen im Randbereich des Trägermaterials statt.

Da das Trägermaterial Silicon über hohe Gaslöslichkeiten und Permeabilitäten verfügt, sollte bei optimalem Mycelbewuchs davon ausgegangen werden, dass bis in das Innere der Siliconperlen alle Zellen optimal mit Sauerstoff versorgt wurden. Ein verstärktes Randmycelwachstum aufgrund einer besseren Sauerstoff- und Substratversorgung an der Trägeroberfläche, und der damit einhergehenden Unterversorgung von Zellen im Inneren der Siliconperlen sollte beim Trägermaterial Silicon ausgeschlossen werden können. Es kann nur vermutet werden, dass sich die Sporen zu Beginn der Anwachsphase, bedingt durch zu geringe Kapillarkräfte, in einer für den Bewuchs der Siliconperlen ungünstig hohen Konzentration im Randbereich des Trägermaterials anreicherten, und so das starke Randmycelwachstum verursachten. Dies ist jedoch nur eine Vermutung, die nicht verifiziert wurde.

Der Vorteil der hohen Gaslöslichkeiten der Siliconperlen, der am Anfang des Versuches mit Sicherheit vorlag, wurde mit zunehmendem Versuchsablauf durch die immer dicker werdende Randmycelschicht zum Nachteil, da das immer dicker werdende Randmycel die O₂-Versorgung in den Perlen behindert. Die Abbildung 6-4 gibt den immer stärker werdenden Bewuchs der Siliconperlen während der Repeated-Batch-Ansätze im Abstand von 14 d wieder. Die Biomasse wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt (hell = Siliconmaterial, dunkel = Pilzmycel). In der Abbildung 6-5 ist eine aufgeschnittene Siliconperle nach 56 Tagen Inkubation dargestellt. Gut erkennbar sind abgestorbene Schichten in den tieferen Schichten des Mycels (dunklere Einfärbung).

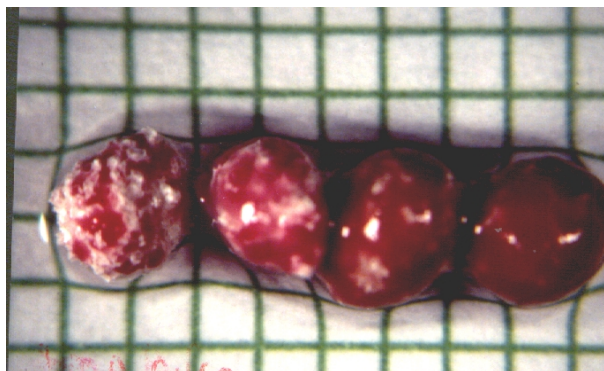


Abb. 6-4. Bewuchs der Siliconträger im Abstand von 14 Tagen (von rechts nach links (Karo im Hintergrund = 1x1mm))

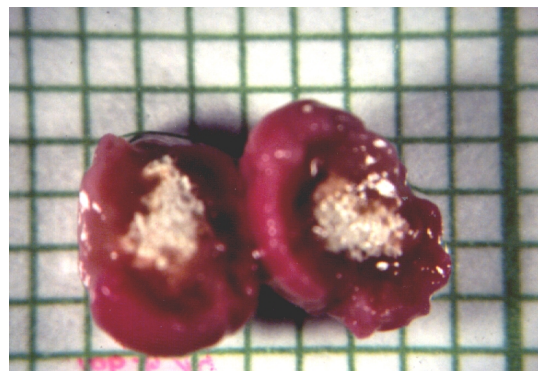


Abb. 6-5. Aufgeschnittener Siliconträger nach 56 Tagen Inkubation (Karo im Hintergrund = 1x1mm)

Nach ca. 3 Wochen stand die Itaconsäurebildung aus den Immobilisaten gegenüber der Itaconsäurebildung aus freien Zellen in keinem realistischen Verhältnis mehr, da durch Desorption und Abrieb die ständig neu gebildeten Zellen von der immer stärker werdenden

Randmycelschicht der Trägeroberfläche abgewaschen wurden und im Endeffekt als frei im Medium vorliegende Zellen zunehmend den Hauptanteil der Gesamt-Itaconsäureproduktion ausmachten. Es stellten sich mit fortschreitender Zeit ähnliche Verhältnisse ein, wie bei einer Itaconsäureproduktion mit freien Zellen. Der Versuch wurde abgebrochen.

Die ermittelten spezifischen Aktivitäten wurden aus diesem Grund auch nur für die ersten vier Batch-Ansätze aus der im jeweiligen Batch-Ansatz gebildeten Gesamt-Itaconsäure bestimmt, da nur hier zum größten Teil von einer Itaconsäureproduktion aus Siliconperlen ausgegangen werden kann. In jedem Batch-Ansatz wurden zwischen den jeweiligen Messpunkten die spezifischen Aktivitäten ermittelt und in der Abb. 6-3 als Balken aufgetragen. Für jeden Batch-Ansatz wurde ebenfalls mittels linearer Regression die maximale spezifische Aktivität ermittelt. Für Siliconperlen ergab sich in den ersten vier auswertbaren Batch-Ansätzen eine **durchschnittliche maximale spezifische Aktivität von $30\text{--}40 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$** .

Bei der Adsorptionsimmobilisierung mit Siliconträgern konnte in dieser Arbeit im Gegensatz zur Matriximmobilisierung (s. Kap. 6.3.3.1) auf eine bessere Biomasseverteilung im Immobilisat kein Einfluss genommen werden. Versuche, bei denen die mit einer geringeren Sporen-Anfangsbeladung im Wachstumsmedium beimpft wurden, ergaben (lediglich nach längeren Zeit) den gleichen starken Randbewuchs auf der Trägeroberfläche.

Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge:

Voraussetzung für hohe Produktivitäten ist eine ausreichende Versorgung der Immobilisate mit Nährstoffen. Ist diese nicht gewährleistet, liegt eine Limitierung der Zellen vor, mit der Folge einer geringeren spezifischen Aktivität der Immobilisate. Beim Einsatz von Immobilisaten kann nur bei kleinen Größen und geringer Aktivität davon ausgegangen werden, dass die Verhältnisse im Immobilisat mit denen im umgebenen Medium identisch sind.

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Mengen an Immobilisat von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 durchgeführt. Dazu wurden 0,2, 0,7 und 1,2 g des Katalysators in jeweils 100 mL Medium eingesetzt. Beim Vergleich der Ansätze fiel auf, dass die spezifischen Aktivitäten bei den niedrigen Immobilisatkonzentration höher sind als diejenigen bei der hohen Immobilisatkonzentration (s. Abb. 6-6).

Bei gleichen Vorbedingungen sollten die Aktivitäten unabhängig von der eingesetzten Katalysatormenge sein. Da im Versuch der Abb. 6-6 dies nicht der Fall war, kann eine Limitierung durch einen äußeren Transportwiderstand angenommen werden, der vermutlich zuerst beim Sauerstoff zu suchen ist. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass bei den in diesem Versuch herrschenden Bedingungen (Geometrie der Kolben, Schüttlerdrehzahl, Aktivität der Zellen) offensichtlich äußere Transportvorgänge limitierend wirken.

Die Perlen innerhalb eines auf dem Rotationsschüttler bewegten Kolbens verhalten sich trotz der Schikanen wie ein „Schwarm“, das heißt, dass die Relativgeschwindigkeit zwischen dem Medium und den Perlenoberflächen nicht für alle Perlen gleich ist, sondern vom Aufenthalts-

ort der Perle innerhalb des Schwarms abhängt. Eine Perle, die sich in der Mitte des Schwarms aufhielt, hätte dadurch eine weitaus dickere Grenzschrift als eine Perle am Außenrand des Schwarms. Die Diffusion von Nährstoffen und Produkt wäre entsprechend behindert.

Nähere Untersuchungen zu einer Limitierung durch einen äußeren Transportwiderstand, der vermutlich zuerst beim Sauerstoff zu suchen ist, wurden an dieser Stelle der Arbeit nicht durchgeführt, da sich die Adsorptionsimmobilisierung für eine Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 gegenüber der Einschlussimmobilisierung (s. Kap. 6.3) nicht durchsetzen konnte. Nähere Untersuchungen zum Thema „äußerer Transportwiderstand“ werden im Kapitel 6.3.3.2 (Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge bei LentiKats®) beschrieben.

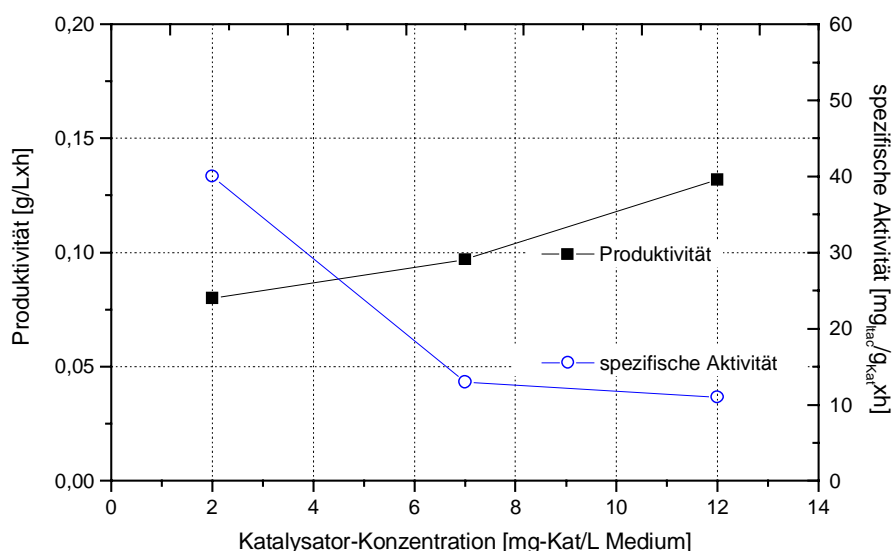


Abb. 6-6. Einfluss der Immobilisatmenge auf Produktivität und spezifische Aktivität

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Beladung:	2-12 g KFM/L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Abschließend muss festgestellt werden, dass die Adsorptionsimmobilisierung auf Siliconträgern im Vergleich zu einer Itaconsäureproduktion mit nativen Mycelpellets kaum Vorteile bringt, da es infolge stärkeren Randmycelwachstums zur Diffusionshemmung und nachfolgendem Absterben der Biomasse in den unteren Schichten kommt. Bei Itaconsäurefermentation mit Siliconperlen würde es, aufgrund der starken Desorption der Zellen aus den Immobilisaten, nicht in dem gleichen Maße wie bei einer Fermentation mit freien Zellen, aber auch zu Rückhalteproblemen und Mycelbewuchs an Fermenterteilen kommen.

6.2.2 Itaconsäureproduktion mit Sinterglas-Kugeln (Schott SIRAN®)

Poröses Sinterglas wird unter dem Namen SIRAN® von der Fa. Schott, Mainz hergestellt und vertrieben. Es ist in unterschiedlicher Form im Handel erhältlich. In dieser Arbeit wurde SIKUG 012 zur Adsorptionsimmobilisierung verwendet. Das sind Glaskugeln von 2 mm Durchmesser. Diese Material ist verhältnismäßig teuer (65 DM/L), und deshalb nur für spezielle Anwendungen geeignet.

Vor dem Einsatz des Trägermaterials im Standard-Produktionsmedium wurde das Trägermaterial mit 100 mL Wachstumsmedium versetzt, welches 10^3 - 10^4 Sporen/mL enthält. Die Inkubation erfolgte 5 d im Dunkeln in 250 mL- Erlenmeyerkolben bei 37°C und einer Rotationsschüttelfrequenz von 120 Upm. Das Pilzmycel verankerte sich in den Poren der Sinterglas-Kugeln und dehnte sich über die Poren der Glaskugeln aus. In der Abbildung 6-7 ist das Porengefüge des Sinterglasmaterials dargestellt, die Abbildung 6-8 zeigt eine bewachsene Sinterglas-Kugel nach 5 Tagen Bewuchs im Wachstumsmedium (der Pilz wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt, hell = Sinterglasmaterial, dunkel = Pilzmycel).



Abb. 6-7. Porengefüge im Material der Sinterglas-Kugeln (Markierung entspricht 100 μ m)



Abb. 6-8. Bewuchs einer Sinterglas-Kugel nach 5 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund entspricht 1x1mm)

Nach der Anwachsphase wurden die Sinterglas-Kugeln abgesiebt und in das Standard-Produktionsmedium übertragen. Im Abstand von 14 d ist ein Mediumswechsel durchgeführt worden. Die Abbildung 6-9 zeigt den Verlauf der Itaconsäureproduktion mit Sinterglas-Kugeln im Repeated-Batch-Ansatz.

Während der durchgeführten Repeated-Batch-Versuche (Abb. 6-9) wurde gleichzeitig der Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge untersucht, indem in den Batch-Ansätzen 1-3 eine Katalysatorbeladung von 12 g/L eingesetzt wurde, während in den Batch-Ansätzen 4-5 die Katalysatorbeladung auf 2 g/L reduziert wurde.

Ähnlich wie bei den Versuchen mit Siliconperlen, wird bei den Versuchen mit Sinterglas-Kugeln die Itaconsäureproduktion aus den Immobilisaten gegenüber der Itaconsäureproduktion durch frei im Medium befindlicher Zellen immer geringer. Die Gründe lagen auch hier in einem immer stärker werdenden Bewuchs des Pilzmycels am Randbereich der Sinterglas-Kugeln. Am Ende der Versuche war die Sinterglas-Kugel mit einer dicken Schicht Pilzmycel bewachsen. Durch Desorption wurden die aktiven Zellen immer wieder abgetragen, die Leistungsfähigkeit des Katalysators sank.

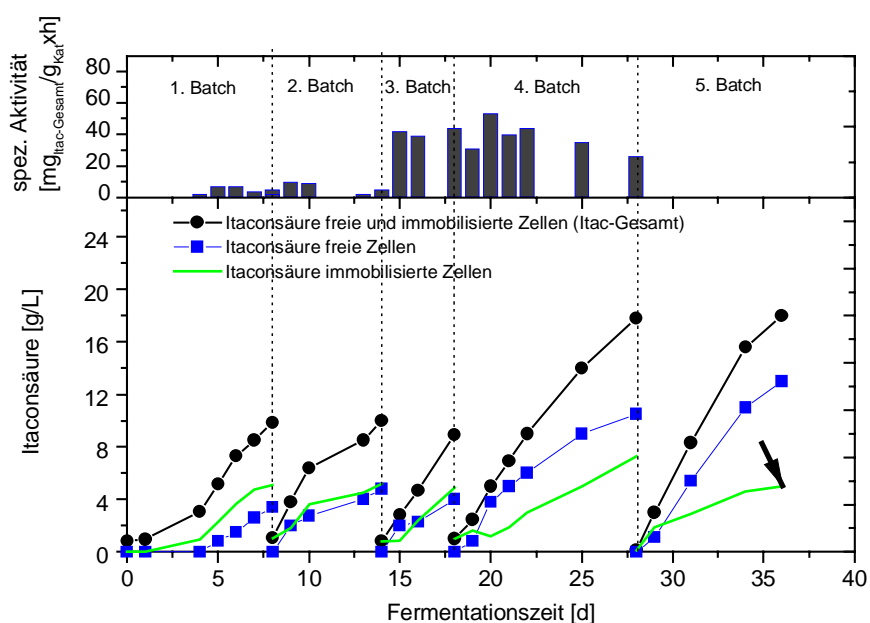


Abb. 6-9. Itaconsäureproduktion mit Sinterglas-Kugeln

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Beladung:	1-3 Batch 12 gKFM/L / 4-5 Batch 2 gKFM/L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Die erreichten spezifischen Aktivitäten im 4-5 Batch-Ansatz (2 g_{Kat}/L) unterschieden sich erheblich von denen im 1-3 Batch-Ansatz (12 g_{Kat}/L). Für den 5 Batch-Ansatz wurden aus den gleichen Gründen wie schon bei den Siliconperlen (immer geringer werdende Itaconsäureproduktion aus den Immobilisaten selbst) keine spezifischen Aktivitäten mehr berechnet.

Die scheinbare Erhöhung der Katalysatoraktivität nur durch Reduktion der Katalysatormenge bei sonst gleichen Versuchsbedingungen war auch bei den Sinterglas-Kugeln, wie auch schon bei den Siliconperlen, ein deutliches Zeichen für eine externe Transportlimitierung, die am ehesten in einer Sauerstofflimitierung zu suchen ist. Für Sinterglas-Kugeln ergab sich für die Batch-Ansätze 3-4 ($2 \text{ g}_{\text{Kat}}/\text{L}$) eine **durchschnittliche maximale spezifische Aktivität von 30-40 $\text{mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$** .

Abschließend muss auch für die Sinterglas-Kugeln festgestellt werden, dass die Adsorptions-immobilisierung auf Sinterglas-Kugeln im Vergleich zu einer Itaconsäureproduktion mit nativen Mycelpellets kaum Vorteile bringt. Durch das extreme Randmycelwachstum kommt es zur Diffusionshemmung und nachfolgendem Absterben der Biomasse in den tieferen Schichten. Ein weiterer großer Nachteil der Sinterglas-Kugeln war ein hoher Glasabrieb bei fortschreitender Einsatzdauer. Im Laufe der Zeit splitterten Sinterglasstücke von den Kugeln ab.

6.3 Immobilisierung durch Matriceinschluss (PVAL)

Bei der Immobilisierung durch Adsorption auf Silicoträgern und Sinterglas kam es zu erheblichen Problemen durch ein extremes Randwachstum und durch Desorption der Biomasse vom Träger. Im Fall der Sinterglasperlen kam es zusätzlich zu mechanischem Glasabrieb. Der Matriceinschluss hat gegenüber der Adsorption den Vorteil des besseren Schutzes der Mikroorganismen vor Abrieb und Desorption. Einschlussverfahren haben desweiteren den Vorteil, dass auf die Biomasseverteilung Einfluss genommen werden kann. Zellanzucht und Immobilisierung können getrennt durchgeführt und damit optimal auf den jeweiligen Anwendungsfall abgestimmt werden. Hochelastische bzw. poröse Materialien ermöglichen das nachträgliche Wachstum innerhalb der Matrix.

In diesem Kapitel werden die Testergebnisse mit zwei Einschlussimmobilisate in Form von Cryogel-Perlen und linsenförmigen Immobilisaten (LentiKats[®]) vorgestellt. Für beide Einschlussimmobilisate wurde das Material Poly(vinylalkohol) (PVAL) verwendet. PVAL verbindet bei der Immobilisierung von Mikroorganismen mechanische und chemische Stabilität mit einer sehr guten Biokompatibilität. Im Schrifttum findet sich lediglich ein Beispiel für die Immobilisierung eines anderen filamentösen Pilzes in PVAL. Dabei handelt es sich um tote Zellen von *Aspergillus clavatus*, die zwecks Produktion des Enzyms Ribonuclease (E.C. 3.1.27.3) in PVAL immobilisiert wurden. Dabei wurden sowohl Sporen [Manolov 1992] als auch Mycel [Manolov et al. 1987] in die Gelmatrix eingeschlossen.

Um die beiden Einschlussimmobilisate (Cryogel-Perlen, LentiKats[®]) hinsichtlich Ihrer Eignung für eine Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 vergleichen zu können, wurden Schüttelkolbenversuche unter definierten Versuchsbedingungen durchgeführt. Anfangs wurde der Poly(vinylalkohol)-Gehalt und der Polyethylenglycol-Gehalt der Matrix im Hinblick auf das Wachstum und die Itaconsäurebildung optimiert. Im Anschluss daran standen Erfahrungen mit der Anzucht und dem Auswachsen der Zellen in bzw. aus den Immobilisaten im Mittelpunkt der Arbeit. Zum Schluss wurden die Immobilisate bezüglich verschiedener Parameter im Schüttelkolben und im 0,5-L- Fermenter charakterisiert. Die Einschlussimmobilisate wurden, wie im Kapitel 4.3.2 beschrieben, vorbereitet und bei täglicher Probenahme zur Bestimmung der Itaconsäureproduktion so lange inkubiert, bis sich eine konstante Itaconsäureproduktion einstellte.

Die bei dieser Art der Versuchsdurchführung auftretenden Schwankungen der Aktivitäten sind versuchsbedingt z.T. durch Sauerstoffmangel und z.T. auf ungenügende Durchmischung zurückzuführen. Diese Limitierungen konnten im Laufe der Versuche durch Verringerung der Katalysatormenge vermindert werden. Die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche dienten nur zum Vergleich der Immobilisate untereinander. Über die absoluten Stoffwechselleistungen und über die Kinetik des Pilzes sagen sie nur wenig aus. Desweiteren kam es bei diesen Versuchen zu nicht quantifizierbaren Limitierungen.

6.3.1 Anpassung der Matrix an *Aspergillus terreus* NRRL 1963

6.3.1.1 Toxizitätstest Polyethylenglycol (PEG)

Bei der Immobilisierung mit Hilfe der Cryogelierung von Polyvinylalkoholen kommen verschiedene Zusatzstoffe zum Einsatz, um den Gelierungsprozess, Eintropftemperatur und die mechanischen Eigenschaften der Perlen günstig zu beeinflussen.

Im Falle von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 bieten sich die Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlicher mittlerer Molekularmassen an, die im Gegensatz z.B. zum Glycerin oder zur Saccharose nicht vom Pilz als C-Quelle verstoffwechselt werden können.

Polyol-Zusätze verändern die Gelfestigkeit sowie die Schmelztemperaturen von Gelen. Während Glycerin die Gelfestigkeit und die Schmelztemperatur herabsetzt, wirkt sich der Zusatz von Polyethylenglycol (PEG) positiv auf die Gelfestigkeit und Schmelztemperatur aus (Lozinsky, 1995, Lozinsky 1996).

Aber auch die verhältnismäßig inerten PEG-Moleküle können grundsätzlich eine giftige Wirkung auf Mikroorganismen entfalten wie Versuche an *Clostridium butyricum* und *Klebsiella pneumoniae* mit PEG 400 gezeigt haben [Wittlich 1996]. Um das toxische Potential von PEG auf den hier verwendeten *Aspergillus terreus* Stamm abschätzen zu können, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, bei denen der Einfluss von PEG der Molekularmassen 400, 600, 1000 und 1500 Da im Konzentrationsbereich zwischen 4 und 10 % (w/v) auf die Itaconsäurebildung als maßgeblich gewünschte Stoffwechselleistung geprüft wird.

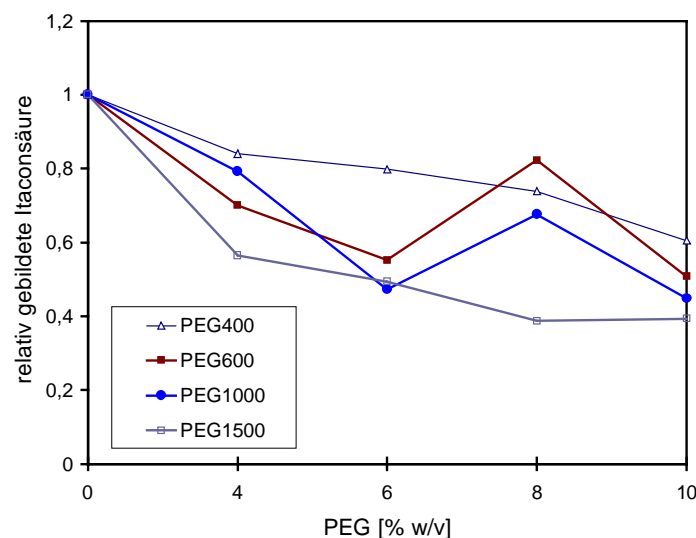


Abb. 6-10. Nach sechs Tagen Inkubation bei 30°C gebildete Itaconsäuremengen bei Anwesenheit verschiedener PEG-Massen, normiert auf Ansätze ohne PEG-Zusatz (=100 %)

Alle Versuche wurden als Doppelansätze in 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikanen durchgeführt. Die Kolben wurden mit 50 ml Minimal-Produktionsmedium mit 50 g/l Glucose und 5 mL Inoculum beschickt. Als Maß für die Stoffwechselaktivität wird die Menge in den Kolben gebildeter Itaconsäure nach sechs Tagen Inkubation herangezogen, wobei je das arithmetische Mittel aus beiden Parallelansätzen gebildet wird. Um die Ergebnisse auch verschiedener Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, werden die Itaconsäurekonzentrationen auf die in der jeweiligen Versuchsreihe mitgeführten PEG-freien Ansätze bezogen. Die Abb. 6-10 zeigt das aus den beiden Versuchsreihen zusammengefasste Ergebnis.

Die nach sechs Tagen in den Ansätzen ohne PEG gefundenen absoluten Itaconsäurekonzentrationen, die als 100% gesetzt werden, betrugen für die erste Versuchsreihe mit PEG 1000 und PEG 1500 1,75 g/L bzw. 3,86 g/L für die zweite Versuchsreihe mit PEG 400 und PEG 600. Die optische Kontrolle der Ansätze zeigte schon nach 2-3 Tagen deutliche Unterschiede. Während die Ansätze ohne Zusatz von PEG ein gelbliches Pellet aufwiesen, wuchs der Pilz unter PEG-Einfluss in einem weißen Mycel heran. Besonders augenfällig war dabei, dass es in fast allen Kolben mit PEG 1000 und PEG 1500 zu Zusammenballungen der Zellmasse kam, die sich als watteartig beschreiben lassen, was dazu führte, dass das Medium ein leicht gelb gefärbtes, aber klares Aussehen bekam. Im Gegensatz dazu traten diese Zusammenballungen bei den PEG 600 Ansätzen nur vereinzelt und bei den PEG 400 Ansätzen überhaupt nicht auf. Dort herrschte eine weiße, mycelhafte Erscheinungsform vor, die bis zum sechsten Tag teilweise in eine mikropelletartige mit Durchmessern unter 1 mm überging.

Generell ist von einem Stoff mit toxischem Potential zu erwarten, dass er seine Wirkung mit steigender Dosis bzw. Konzentration auch zunehmend entfaltet (Dosis-Wirkungs-Beziehung). Dies scheint auch im Falle des PEG zuzutreffen, wenn man von den Ergebnissen mit PEG 600 und PEG 1000 absieht, wo bei 8% Anteil gegenüber dem 4 % Anteil eine höhere Itaconsäurekonzentration und damit niedrigere toxische Wirkung festgestellt wurde (Abb. 6-10). Dies ist vermutlich auf die o.g. Ungenauigkeitsfaktoren ebenso wie der ausgesprochen niedrige Wert bei 6 % Anteil an PEG 1000 zurückzuführen (die Werte bei 8% PEG müssen als „Außerreißer“ betrachtet werden). Ansonsten zeigt sich, dass bei höheren PEG Zusätzen auch die Itaconsäurebildung in verstärktem Maße herabgesetzt wurde, der Stoff also eine toxische Wirkung auf *Aspergillus terreus* NRRL 1963 besaß.

Bezüglich der mittleren Molekularmasse des verwendeten PEG ergab sich dabei eine Differenzierung, denn mit zunehmender Größe der PEG-Moleküle nahm auch ihre schädliche Wirkung auf die Itaconsäureproduktion zu. Für kleinere Moleküle wie das PEG 400, das von der Größenordnung im Bereich eines Disaccharids (360 Da) lag, ist vermutlich die schädliche Wirkung auf ein Eindringen in die Zelle zurückzuführen, wo dann Wechselwirkungen mit Zellkompartimenten stattfanden. Da ein enzymatischer Abbau des PEG in *Aspergillus terreus* NRRL 1963 nicht möglich ist, kann sich die toxische Wirkung so entfalten. Eine Schädigung allein aufgrund der auch nicht unbeträchtlichen osmotischen Wirkung des PEG spielt wahrscheinlich keine Rolle, da in den meisten Produktionsmedien Zuckerkonzentrationen

von 10, 15 oder 20 % keine Seltenheit sind und keine negative Wirkung bekannt sind. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, dass die Giftigkeit des PEG 1500 über derjenigen des PEG 600 und 1000 liegt. Dies kann mit den optischen Beobachtungen von wattenartigen Zusammenballungen des Mycels in Zusammenhang gebracht werden, die sich besonders bei den höhermolekularen PEG-Sorten bemerkbar machten. Offensichtlich werden die dielektrischen Eigenschaften des Mediums und/oder die Zellwandoberflächen durch die höhermolekularen PEG derart verändert, dass es zu einer bevorzugten Anlagerung von Zellmaterial kommt mit allen daraus folgenden, negativen Konsequenzen wie verminderte Oberfläche, erhöhter Diffusionswiderstand für Nährstoffe (auch Sauerstoff) und Produkte.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind auf zwei Phänomene zurückzuführen. Die niedermolekularen PEG-Sorten 400 und 600 wirken v.a. aufgrund eines direkten Eingriffs in den Stoffwechsel der Zellen, während mit zunehmender mittlerer Molekularmasse die Förderung von großen Zellaggregaten indirekt die Stoffwechselleistungen behindert. Da die direkte Beeinträchtigung des Stoffwechsels sich bei vergleichbaren Konzentrationen weniger stark bemerkbar macht als die indirekte, aggregationsfördernde Wirkung der höhermolekularen PEG ist also aus toxikologischer Sicht von den untersuchten Stoffen der Einsatz von PEG 400 und PEG 600 als Hilfsstoff bei der Cryogelierung zu empfehlen, nicht jedoch der von längerkettigen PEG-Sorten.

6.3.1.2 Toxizitätstest Polyvinylalkohol (PVAL)

Zur Beurteilung der toxischen Wirkung von PVAL auf *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurden zwei Ansätze mit 2 % PVAL (17/99) und zwei Ansätze ohne PVAL angesetzt (alle vier Ansätze ohne PEG). Optisch verhielt sich der Pilz unter Einwirkung von 2 % PVAL ähnlich wie in den Vergleichsansätzen als gelbliches Pellet. Der Versuch mit 2 % PVAL zeigte, dass auch vom nicht gelierten PVAL eine toxische Gefahr für *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ausgeht (Abb. 6-11).

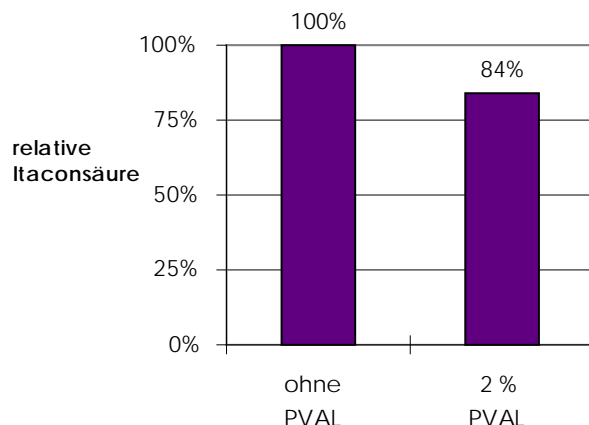


Abb. 6-11. Nach sechs Tagen gebildete Itaconsäurekonzentration bei Anwesenheit von 2 % (w/v) PVAL 17/99 (bezogen auf 30°C Ansätze)

Aus Experimenten sowohl an Ratten wie auch an tierischen Zellkulturen ist bekannt, dass vom PVAL direkt keine akute toxische Gefahr ausgeht [Hoechst 1991]. Da es sich aber auch im gelösten Zustand um einen recht hochmolekularen Stoff mit mittlerer Molmasse von 61 kDa handelt und auch schon bei kleinen Lösungsanteilen eine starke Viskositätszunahme zu beobachten war, kann allein die erschwerte Diffusion von Substraten und Produkten zur hier beobachteten Stoffwechselabnahme geführt haben. Diese Erkenntnisse haben bezüglich der Cryogelierung keinerlei Auswirkung, da in der Gelmatrix kein gelöstes PVAL verbleibt.

6.3.1.3 Matrixzusammensetzung

Im selben Zeitraum, in der die Toxizitätstests von PEG und PVAL mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 durchgeführt wurden, wurden am gleichen Institut von Jekel (1999) linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®) in Bezug auf ihre mechanischen Eigenschaften charakterisiert. Linsenförmige PVAL-Biokatalysatoren (LentiKats®) sind makroporöse PVAL-Hydrogele. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden bei der Wahl der Matrixzusammensetzung in dieser Arbeit berücksichtigt.

Mit der Veränderung der Gelstruktur variieren die mechanischen Eigenschaften der PVAL-Hydrogele. Eine hohe Reißfestigkeit bei hoher Elastizität wird bei der Verwendung des Zusatzstoffes PEG 1000 erzielt. Sowohl mit steigender Konzentration des Zusatzstoffes PEG 1000 als auch mit zunehmender PVAL-Konzentration nimmt der E-Modul zu, während die Reißdehnung um Werte zw. 350 und 450 % schwankt (1999).

Aufgrund der Ergebnisse von Jekel (1999) musste bezüglich des PEG-Einsatzes ein Kompromiss zwischen mechanischen Eigenschaften und der festgestellten Toxizität getroffen werden, der endgültig mit dem Einsatz von PEG 1000 als Hilfsstoff bei der Cryogelierung geschlossen wurde. Für die Einschluss-Immobilisierung mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wird die Zusammensetzung von 10% (w/w) PVAL 17/99 und 6 % (w/w) PEG 1000 standardisiert.

6.3.2 Cryogel-Perlen

6.3.2.1 Wachstum und Itaconsäureproduktion in Cryogel-Perlen

Aspergillus terreus NRRL 1963 wurde durch Cryogelierung in Cryogel-Perlen eingeschlossen (s.Kap. 4.3.2.1). Dabei wurde ein Verfahren zur Immobilisierung von Sporen (6×10^5 Sporen/mL-Gel) eingesetzt.

Nach der Immobilisierung der Sporen wurden die hergestellten Perlen zur Anzucht der Biomasse 4 d im Wachstumsmedium inkubiert. In der Abbildung 6-12 ist eine bewachsene Cryogel-Perle dargestellt (der Pilz wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt, hell = PVAL-Material, dunkel = Pilzmycel).

Die Abbildung 6-13 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme des Pilzbewuchses am Rande einer Cryogel-Perle nach 4 Tagen Bebrütung im Wachstumsmedium.

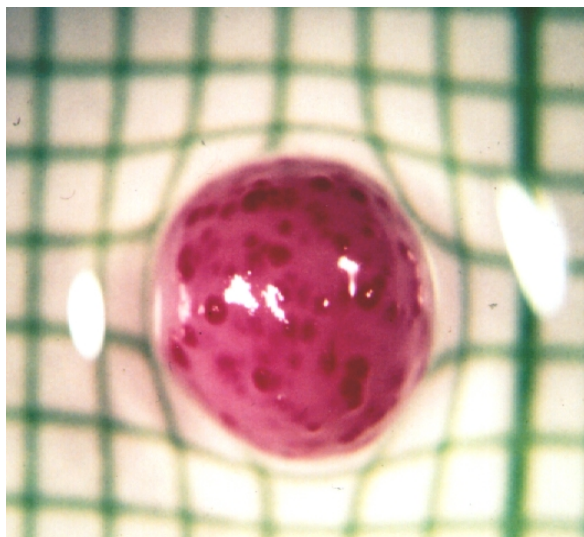


Abb. 6-12. Bewuchs der Cryogel-Perle nach 4 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1mm)

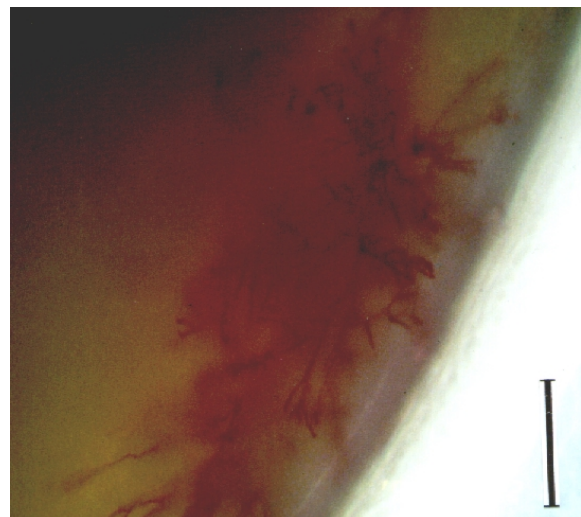


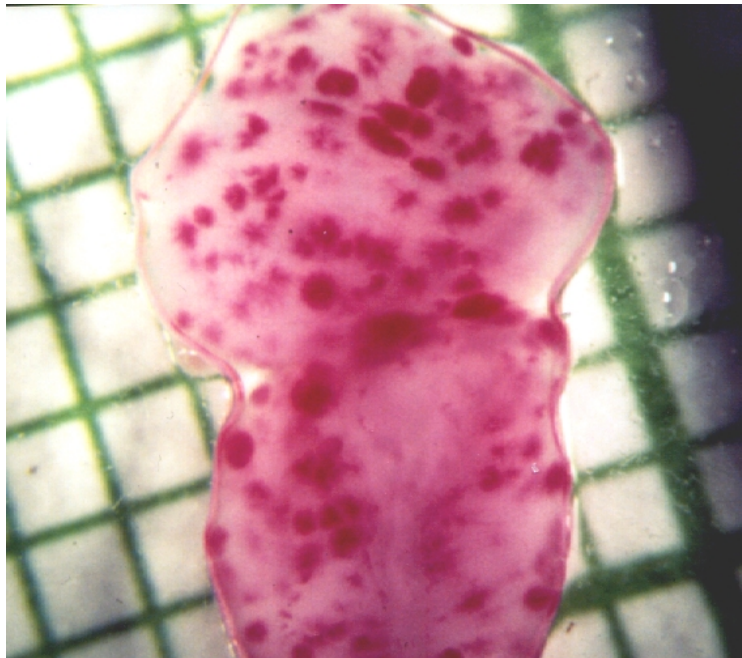
Abb. 6-13. Pilzbewuchs am Rand der Cryogel-Perle nach 4d Wachstumsmedium; Markierung 100 μ m

Obwohl der Matriceinschluss gegenüber der Adsorptionsimmobilisierung den Vorteil des besseren Schutzes der Mikroorganismen vor Abrieb und Desorption hat, kann es auch bei der Einschluss-Immobilisierung zum Auswachsen der Biomasse aus den Immobilisaten kommen. Um dies zu verhindern, gibt es die Möglichkeit des Einsatzes gecoateter Einschlussimmobilisate [Tanaka et al. 1989, Vorlop et al 1987]. Bei der Itaconsäureproduktion mit Cryogel-Perlen nimmt die Itaconsäureproduktion der immobilisierten Zellen im Gegensatz zu den Adsorptionsimmobilisaten im Verlauf des Repeated-Batch-Versuches nicht

so stark ab (Abb. 6-16) wie bei den Siliconperlen und Siranglas-Kugeln. Auf die Methode gecoateter Einschlussimmobilisate wurde deshalb in dieser Arbeit nicht eingegangen.

Der große Vorteil der Matriximmobilisierung liegt darin, dass die Sporenmenge und -verteilung in den Immobilisaten direkt beeinflusst und fixiert werden kann, was dazu führt, dass es zu keinem extremen Mycelrandwachstum bei Cryogel-Perlen kam.

Die Abbildung 6-14 veranschaulicht, durch einen Schnitt der Perle, dass es mit der verwendeten Immobilisierungsmethode und der verwendeten Sporen-Anfangskonzentration zu einer gleichmäßigen Verteilung der Sporen im Gel kommt.



**Abb. 6-14. Geschnittene Cryogel-Perle nach 4 d Anwachsphase
(Karo im Hintergrund entspricht 1x1mm)**

Nach ca. 8 Wochen Inkubation im Produktionsmedium wurden jedoch auf der Oberfläche der Perlen Löcher beobachtet. Der Grund dieser Löcher war, dass der Pilz auch in den Cryogel-Perlen in geringem Umfang während der Produktionsphase weiterwuchs und so einige Pilzkolonien die Cryogel-Perle durch Druck auf die Matrixwand verlassen konnten. Die Abbildung 6-15 dokumentiert diesen Sachverhalt.

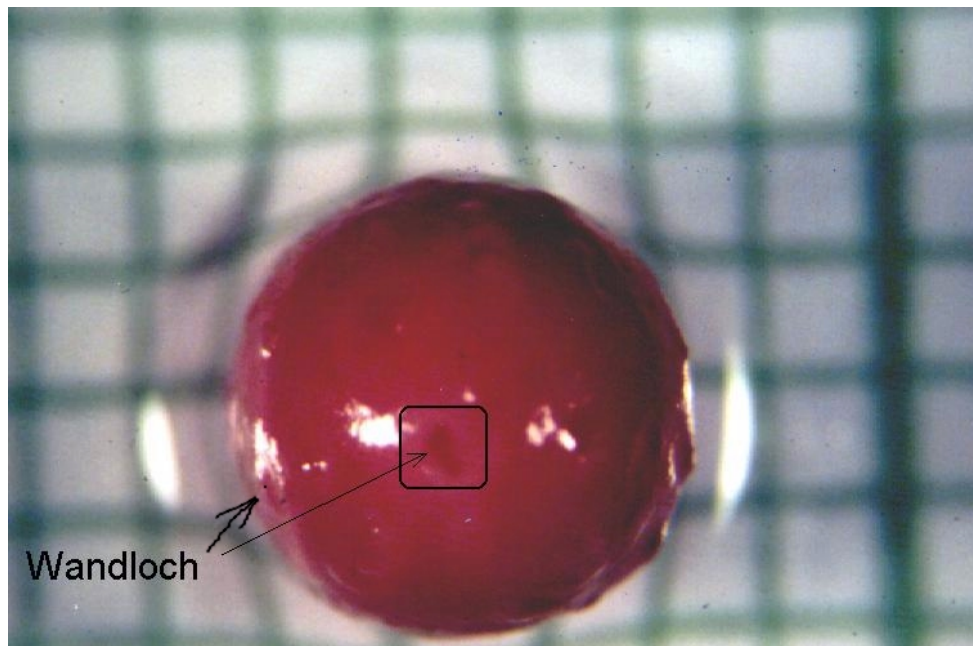


Abb. 6-15. Wandlöcher auf der Cryogel-Perle nach 8 Wochen Inkubation (Karo im Hintergrund entspricht 1x1mm)

Nach der Anwachsphase wurden die Cryogel-Perlen abgesiebt und in das Standard-Produktionsmedium übertragen. Die Abbildung 6-16 zeigt den Verlauf der Itaconsäureproduktion mit Cryogel-Perlen im Repeated-Batch-Ansatz.

Während der durchgeführten Repeated-Batch-Versuche wurde gleichzeitig der Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge untersucht, indem im 1-2 Batch-Ansatz eine Katalysatorbeladung von 12 g/L eingesetzt wurde und im Batch-Ansätze 3-5 die Katalysatorbeladung auf 2 g/L reduziert wurde.

Die erreichten spezifischen Aktivitäten im Batch-Ansatz 3-5 (2 g_{Kat}/L) unterschieden sich erheblich von denen im 1 und 2 Batch-Ansatz (12 g_{Kat}/L). Die scheinbare Erhöhung der Katalysatoraktivität nur durch Reduktion der Katalysatormenge bei sonst gleichen Versuchsbedingungen war auch bei den Cryogel-Perlen, wie bereits bei den Siliconperlen und Sinterglas-Kugeln, ein deutliches Zeichen für eine externe Transportlimitierung, die am ehesten in einer Sauerstofflimitierung zu suchen ist. Für Cryogel-Perlen ergab sich für die Batch-Ansätze 3-5 (2 g_{Kat}/L) eine **durchschnittliche maximale spezifische Aktivität von 30-40 mg_{Itac}/g_{Kat}·h**.

Auch nach über 50 Tagen Inkubation der Perlen im Standard-Produktionsmedium war kein Abfall der Aktivität der Immobilisate zu verzeichnen, was auf eine gute Prozessstabilität hinweist.

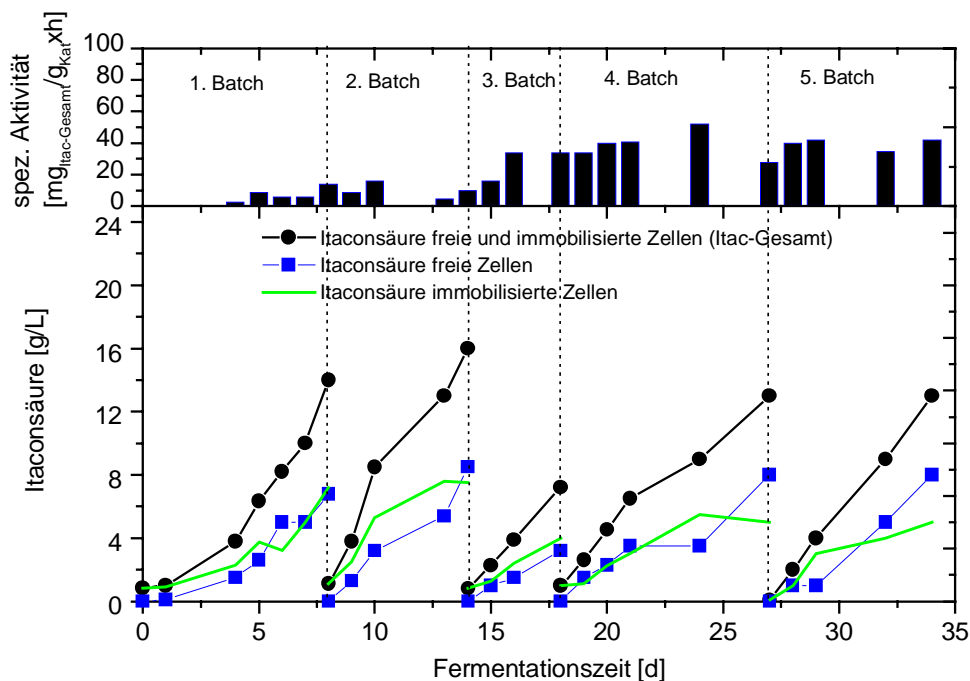


Abb. 6-16. Itaconsäureproduktion mit Cryogel-Perlen

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Katalysator-Beladung:	1.-2. Batch 12g KFM/L / 3.-5. Batch 2g KFM/L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur:	37°C
	pH-Wert:	3.1

6.3.2.2 Einfluss der Perlengröße

Der wesentliche Vorteil der Einschluss-Immobilisierung gegenüber der Adsorptions-Immobilisierung, der bessere Schutz der Mikroorganismen vor Abrieb und Desorption und der Einfluss auf die Biomasseverteilung (kein Randmycelwachstum) führte zwar zu einer längeren Prozessstabilität der Cryogel-Perlen, aber die durchschnittliche maximale spezifische Aktivität bei den verwendeten Cryogel-Perlen unterschied sich nicht wesentlich von denen der Adsorptionsimmobilisierung.

Den Vorteilen der Einschluss-Immobilisierung stehen häufig eine geringere Aktivität der immobilisierten Biomasse und ein zusätzlicher Transportwiderstand durch die umgebende Gelmatrix als Nachteile gegenüber.

Beim Einschluss aerober Mikroorganismen wird ein unlimitiertes Wachstum lediglich peripher bis zu einer Tiefe von 150 μm und limitiert bis zu 300 μm beobachtet [Kurosawa et al 1990]. Die Werte variieren je nach immobilisierten Mikroorganismen, der Zelldichte und -verteilung sowie verwendetem Hydrogel und zugesetzten Additiven [Scott et al 1998, Gosmann 1988]. Generell ist jedoch ein unlimitiertes Wachstum aerober Mikroorganismen nur bis zu einer Schichtdicke bis zu 200 μm realistisch [Chang et al 1988, Wijffels et al 1996]. Der negative Einfluss des zusätzlichen Transportwiderstandes spielt bei geeigneten Geleigenschaften und geringer Größe der Immobilisate für die Diffusion von niedermolekularen Stoffen eine untergeordnete Rolle. Die Reduktion der Perlengröße $< 1\text{ mm}$ ist vom ökologischen Standpunkt aus betrachtet die zur Zeit sinnvollste Methode, Diffusionslimitierungen im Immobilisat zu minimieren.

Um den Einfluss der Perlengröße auf die Itaconsäureproduktion zu überprüfen, wurden Perlen mit einem Durchmesser von 800-2000 μm mit einer an der FAL Braunschweig, am Institut für Technologie entwickelten Apparatur hergestellt (s. Kap. 4.3.2.1, Immobilisierung in cryogelierte Polyvinylalkohol-Perlen). Im untersuchten Bereich zwischen 800-2000 μm konnten nur geringfügig höhere Aktivitäten für Perlen mit einem Durchmesser von 800 μm , gegenüber den Perlen mit 1500 μm und 2000 μm erreicht werden. Die Reduktion der Perlengröße hätte noch höher gewählt werden müssen, um die Diffusionslimitierungen im Immobilisat zu minimieren. Wenn man von den Beobachtungen von Kurosawa (1990) ausgeht, die beim Einschluss aerober Mikroorganismen ein unlimitiertes Wachstum lediglich peripher bis zu einer Tiefe von 150 μm feststellte, wären Durchmesser um die 300 μm angebracht gewesen. Mit der vorhandenen Apparatur war dies jedoch nicht möglich. Mit einem Perlendurchmesser $< 1\text{ mm}$ muß jedoch mit Problemen der Abtrennung der Immobilisate gerechnet werden. Desweiteren ist der Vorteil der Langzeitstabilität aufgrund des Abriebs nur bei der Verwendung hochelastischer Polymere gewährleistet.

Um eine Minimierung der beschriebenen Nachteile beim Einschluss-Immobilisat PVAL-Perle zu erreichen, wurde besonders intensiv ein neues Verfahren für den Geleinschluß (Lenti-Kats[®]) untersucht (Kap. 6.3.3). Der große Vorteil dieser Einschluss-Immobilisate liegt in ihrer geringen Dicke von 200-400 μm , welche die Diffusionslimitierungen innerhalb der Gelmatrix herabsetzt.

6.3.2.3 Einfluss der Lagerung von Cryogel-Perlen

Nachdem Immobilisate dreimal in Repeated-Batch-Betriebsweise eingesetzt wurden, sind diese 3 Monate bei 4°C in einem Minimalmedium gelagert worden, bevor sie erneut zur Itaconsäureproduktion eingesetzt wurden. Eine dreimonatige Lagerung von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in Cryogel-Perlen bei 4°C war ohne Aktivitätseinbußen möglich.

6.3.3 LentiKats®

Alternativ zur Immobilisierung der Mikroorganismen in Cryogele wurde der Einschluss der Sporen in sogenannte LentiKats® untersucht. LentiKats® können, wie andere Immobilisate, wiederholt für die Umsetzung von C-Quellen zu Itaconsäure verwendet werden. Dabei werden die Pilzsporen bei Raumtemperatur in PVAL-Hydrogele wie im Kapitel 4.3.2.2 beschrieben eingeschlossen. Wichtige Vorteile der LentiKats® sind neben einem Durchmesser von ca. 3 mm zur vereinfachten Rückhaltung der Immobilisate vor allem die geringe Dicke von 200-400 µm, die die Diffusionslimitierungen innerhalb der Gelmatrix herabsetzt (Abb. 6-17). Mit der Herstellung von LentiKats® steht ein Verfahren zur Verfügung mit dem bei Raumtemperatur elastische und reißfeste PVAL-Hydrogele ohne den Zusatz toxischer Vernetzer erhalten werden (s. Kap. 4.3.2.2).

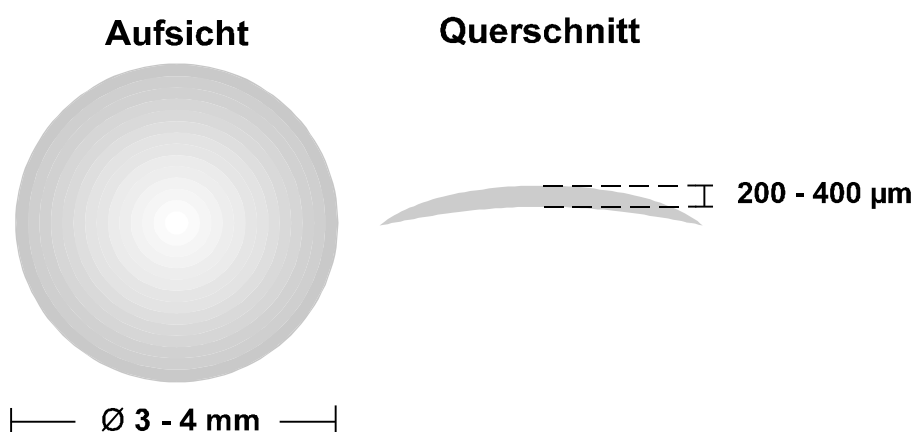


Abb. 6-17. Schematische Darstellung eines LentiKats®

6.3.3.1 Pilzwachstum und Einfluss der Anfangs-Sporenbeladung

Bei der Herstellung von Einschlussimmobilisaten ist der Anteil der eingesetzten Sporen und deren gleichmäßige Verteilung für eine optimale Katalysatorausnutzung und eine hohe Aktivität von entscheidender Bedeutung. Der Geleinschluss der Sporen lässt eine spätere Umverteilung der Biomasse nicht mehr zu. Der Anfangsgehalt der Sporen wurde daher variiert und die Itaconsäurebildung sowie die Verteilung der Biomasse untersucht.

Um den Einfluss der Sporenbeladung zu ermitteln, wurden Immobilisate mit verschiedenen Sporenkonzentrationen hergestellt und in Schüttelkolbenkultur inkubiert. Die Anzucht des *Aspergillus terreus* NRRL 1993 in den LentiKats® erfolgte 4 d bei 37°C und 120 Upm Schüttelleistung im Wachstumsmedium. Hier wuchsen die Sporen aus und das Mycel verbreitete sich im PVAL-Material. In dieser Zeit wurde kaum Itaconsäure gebildet.

In der Abbildung 6-18 sind LentiKats® mit drei Sporen-Anfangsbeladungen nach Ihrer Anzucht im Wachstumsmedium gegenübergestellt (der Pilz wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt, hell = PVAL-Material, dunkel = Pilzmycel).

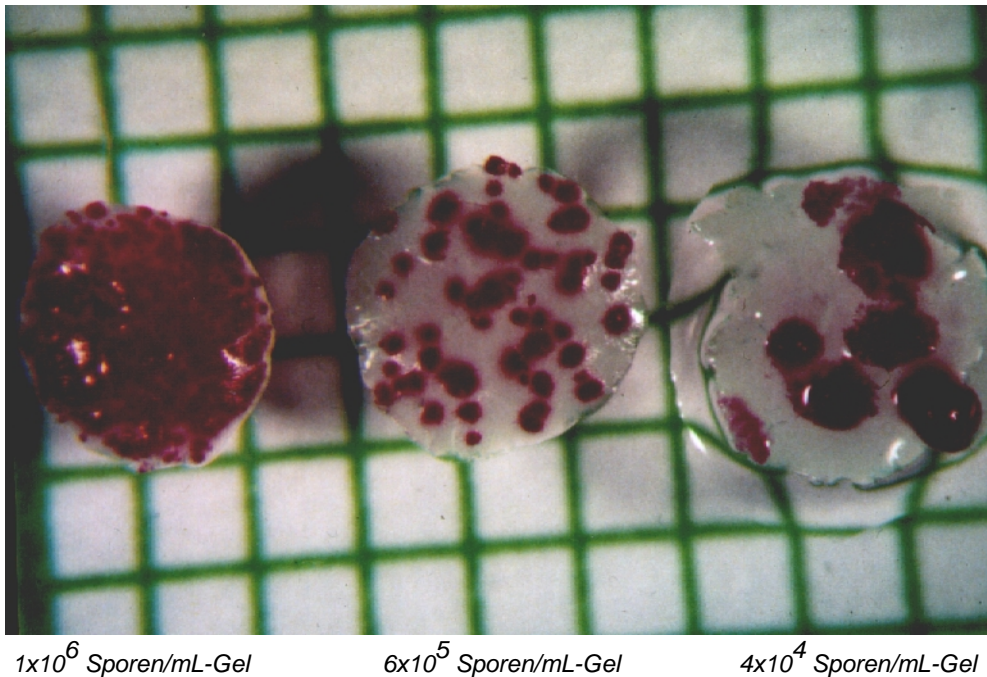


Abb. 6-18. LentiKats® mit unterschiedlicher Sporen-Anfangsbeladung nach 4 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1mm)

Im Wachstumsmedium keimten die Pilzsporen aus und bildeten zuerst "Mycelhöfe". Diese "Mycelhöfe" dehnten sich im Gel in den Gelporen aus. Anhand der Abbildung 6-18 ergibt sich für die Beladung von 6×10^5 Sporen/mL-Gel, über ein Auszählen der ausgewachsenen Kolonien bezogen auf die eingesetzte Sporenmenge, eine Auskeimrate von 10%. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr näher auf die für Pilzsporen doch recht geringe Auskeimrate mit diesem schonenden Herstellungsverfahren eingegangen werden konnte, sollten sich zukünftige Arbeiten näher mit der Optimierung der Auskeimraten beschäftigen.

Allmählich kommt es zur Erhöhung des Druckes der Gelmatrix auf die Kolonien, wodurch sich das Wachstum verlangsamt. An diesem Punkt wurden die Immobilisate in das Standard-Produktionsmedium übertragen, in welchem durch Phosphatlimitierung das Wachstum verringert und die Itaconsäureproduktion aktiviert werden soll.

Nach der Zellanzucht im Gel und Erreichen des Steady state im Standard-Produktionsmedium wurden die mit unterschiedlicher Sporen-Anfangsbeladung immobilisierten LentiKats® bezüglich ihrer spezifischen Aktivität und ihres Auswuchsverhaltens untersucht. Es wurden 4 Repeated-Batch-Ansätze durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigte der am stärksten beladene Katalysator zunächst die höchste Aktivität.

Dies änderte sich jedoch nach dem 2. Batch-Einsatz. Spätestens nach dem 3. Einsatz stellte sich heraus, dass die geringer beladenen LentiKats® die höheren Itaconsäureproduktionen erreichten. Die höchste spezifische Aktivität wurde bei einer Beladung von 6×10^5 Sporen/mL-Gel erreicht (Abb. 6-19). Eine Folge einer zu hohen Beladung kann eine unzureichende Substratversorgung im Inneren der Immobilisate sein. Die dort vorhandene Mycelmasse stirbt ab.

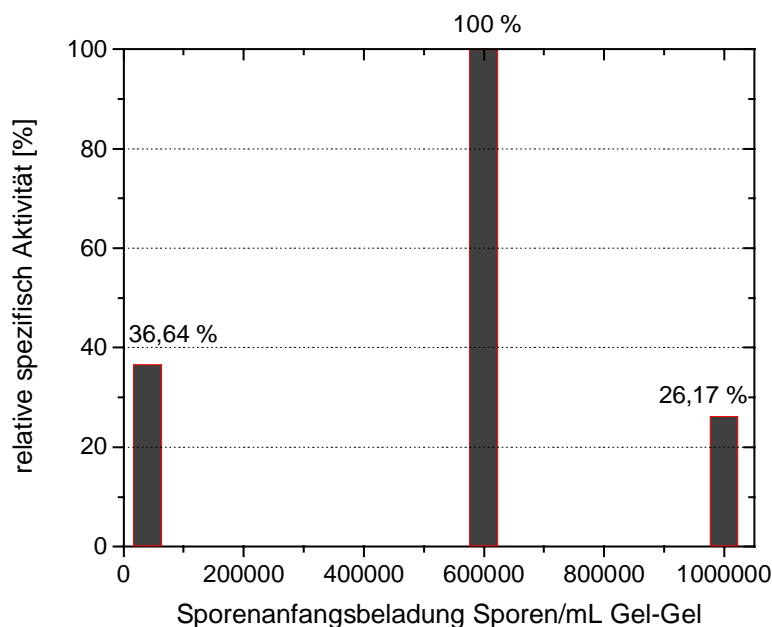


Abb. 6-19. Einfluss der Sporenanfangsbeladung auf die Aktivität der Immobilisate nach Erreichen des Stady state nach 4 Inkubation (insgesamt 45 Tage)

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Immobilisatmenge:	12 g KFM/L (3 untersch. Sporenbeladung)
	Substrat:	60 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Die Anfangssporenbeladung beschreibt das Immobilisat nur zum Zeitpunkt der Herstellung. Im Laufe der Inkubation ändert sich der Biomasseanteil im Immobilisat. Analog zur BTM-Bestimmung einer Suspension lässt sich das Trockengewicht von LentiKats® ermitteln.

Aus der Trockenmasse-Differenz zwischen frisch hergestellten und bereits inkubierten LentiKats® der gleichen Immobilisat-Charge kann man die gebildete BTM des bewachsenen LentiKats® bestimmen. Am Ende der Versuche wurde auf diese Weise eine BTM-Bestimmung der Mycelmasse in den Immobilisaten vorgenommen. Die Gesamtmenge der Endbiomasse in den geringer beladenen LentiKats® war höher, als in den anfangs höher beladenen Immobilisaten. Die geringer beladenen LentiKats® bilden durch die größere Raumverteilung gleichmäßig verteilte, besser versorgte, größere „Mycelhöfe“ aus, welche aktiv sind und nicht in Ihrer Substratversorgung „abgeschnürt“ werden.

Bei LentiKats® mit einer Anfangs-Sporenbeladung von 1×10^6 Sporen/mL-Gel trat recht schnell eine Formveränderung der LentiKats® auf. Die linsenförmigen LentiKats® krümmen sich und rollen zusammen. Die Abbildung 6-20 zeigt die Veränderung des LentiKats® nach 4 Wochen Inkubation mit der Anfangs-Sporenbeladung von 1×10^6 Sporen/mL-Gel. Die Pilze wurde mit einer Carbol-Fuchsin-Lösung angefärbt (hell = PVAL-Material, dunkel = Pilzmycel).



Abb. 6-20. *LentiKats® mit einer Beladung von 1×10^6 Sporen/mL-Gel nach 4 Wochen Inkubation (Karo im Hintergrund entspricht $1 \times 1 \text{ mm}$)*

Zu Beginn des Wachstums liegt eine gleichmäßige Verteilung der Sporen im Katalysatorinneren vor. Wegen des geringen Abstandes der Sporen kommt es bei hochbeladenen LentiKats® bei größer werdenden "Mycelhöfen" im Katalysatorinneren zu einer schlechteren Substratversorgung. Die starke Mycelbildung bei hoher Biomasse-Anfangsbeladung im Randbereich der Immobilisate verhindert ein Wachstum der Zellen im Inneren des Katalysators. Das am Rand der LentiKats® stark bewachsene Mycel verbraucht das eindiffundierende Substrat vollständig. Es kommt so mit der Zeit zu einer Substratunterversorgung im Katalysatorinneren. Das starke Mycelwachstum in den Oberflächenbereichen führt zu einer Art "gespanntem Außenring", welcher sich nach innen krümmt und einrollt (schematisch s. Abb. 6-21). Hierdurch kann es zu einer weiteren Unterversorgung in Teilen des Katalysators kommen, da durch das Einrollen die für den Stoffaustausch mit der Umgebung notwendige mediums zugewandte Oberfläche verringert wird und in der geformten "inneren Höhle" eine schlechtere Durchmischung und extensive Stofftransportlimitierung stattfindet. Diese beschriebenen Formveränderungen traten bei gering beladenen LentiKats®, auch bei längerem Einsatz, nicht auf. Die gebildeten "Mycelhöfe" lagen ausreichend verstreut im Gel vor und wurden genügend mit Nährstoffen versorgt. Dies führt zur Bildung großer "Mycelhöfe". Eine ähnlich Beobachtung machte C. Reimann (1999) bei der Immobilisierung von *Klebsiella pneumoniae* in LentiKats®.

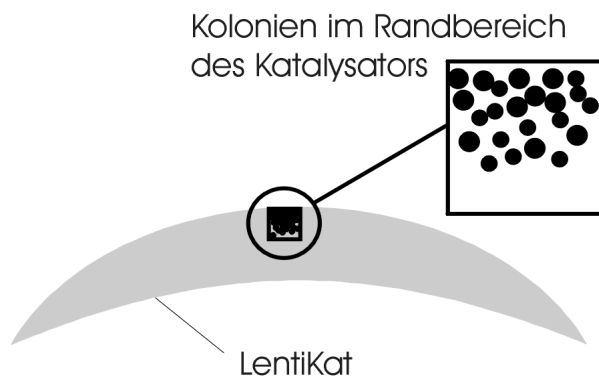


Abb. 6-21. Schematische Darstellung des Randwachstums im LentiKats®

Mit der optimalen Sporen-Anfangsbeladung von 6×10^5 Sporen/mL-Gel wurden in Repeated-Batch-Betriebsweise Versuche zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens und der Itaconsäurebildung durchgeführt. Die Abbildung 6-22 zeigt den Verlauf der Itaconsäureproduktion mit LentiKats® im Repeated-Batch-Ansatz.

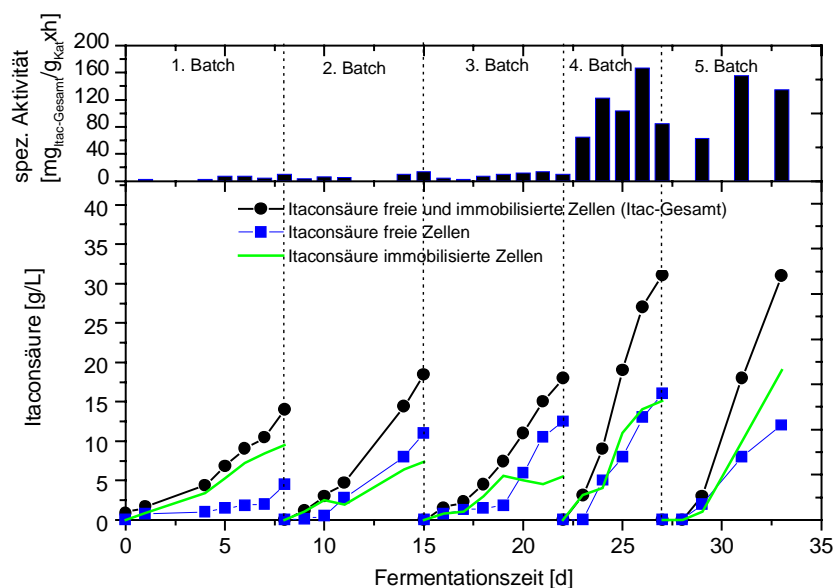


Abb. 6-22. Itaconsäureproduktion mit LentiKats®

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Beladung:	1.-3. Batch 12g KFM/L; 4.-5. Batch 2g KFM/L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Aus der Abbildung 6-22 wird folgendes deutlich:

-die Itaconsäureproduktion direkt aus den Immobilisaten bleibt bei LentiKats[®], wie bereits beim Einschluss-Immobilisat Cryogel-Perle, im Gegensatz zu den Adsorptionsimmobilisaten, im Verlauf des Versuches so gut wie konstant

-durch den Einfluss auf Sporenmenge und -verteilung in den Immobilisaten der Einschluss-Immobilisierung kommt es zu keinem extremen Mycelrandwachstum, was zu einer längeren Prozessstabilität führt.

Wie aus der Abbildung 6-22 ersichtlich, konnten mit LentiKats[®] bei einer Beladung von 2 g/L Immobilisat erheblich höhere maximale spezifische Aktivitäten ($100\text{--}130 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$) als mit den Adsorptions-Immobilisaten, aber auch dem Einschluss-Immobilisat PVAL-Perle erreicht werden. Die Ursache hierfür wird in der geringen Dicke der LentiKats[®] von 200-400 μm gesehen, durch die Diffusionslimitierungen innerhalb der Gelmatrix herabgesetzt wurden.

Die molaren Ausbeuten im Versuch der Abbildung 6-22 bezogen auf Glucose betrugen im Batch-Ansatz 4 und 5 ca. 80 %. Die erreichten maximalen spezifischen Aktivitäten von $100\text{--}130 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$ liegen weit über denjenigen von Kautola et al. (1985), die mit einer spezifischen Aktivität von $18,46 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$ mit ihren Celite[®]- Adsorptionsimmobilisaten im Festbettreaktor die bisher höchsten Aktivitäten aller immobilisierten *Aspergillus terreus* Formen erreichte. Legt man die in dieser Arbeit mit LentiKats[®] erzielten spezifischen Aktivitäten von ca. $100 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$ zugrunde, so wären bei einem im Rührkesselreaktor noch möglichen Einsatz von 250 g/L KFM spezifische Aktivitäten von ca. $25 \text{ g}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\cdot\text{h}$ erreichbar.

Die **Einschluss-Immobilisierung mit LentiKats[®]** erwies sich in der vorliegenden Arbeit als **die am besten geeignete Immobilisierungsmethode** zur Itaconsäureproduktion mit *Asp. terreus* NRRL 1963. Die Vorteile der Einschluss-Immobilisierung mit LentiKats[®] liegen:

- in der geringen Dicke der LentiKats[®] (200-400 μm), mit der Folge, dass Diffusionslimitierungen in der Matrix minimiert werden können;
- in der Möglichkeit, auf Sporenmenge und -verteilung in den Immobilisaten Einfluss zu nehmen und
- in der hohen Prozessstabilität der LentiKats[®].

Während der durchgeführten Repeated-Batch-Versuche der Abbildung 6-22 wurde gleichzeitig wieder der Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge untersucht, indem in den Batch-Ansätzen 1-3 eine Katalysatorbeladung von 12 g/L eingesetzt wurde, während in den Batch-Ansätze 4-5 die Katalysatorbeladung auf 2 g/L reduziert wurde. Da sich die spezifischen Aktivitäten im Batch-Ansatz 4-5 ($2 \text{ g}_{\text{Kat}}/\text{L}$) auch bei LentiKats[®] wieder erheblich von denen im Batch-Ansatz 1-3 ($12 \text{ g}_{\text{Kat}}/\text{L}$) unterschieden, wurde im folgenden Kapitel das Thema externe Transportlimitierung näher untersucht.

6.3.3.2 Einfluss der Temperatur auf die Itaconsäurebildung in LentiKats®

Die Temperatur ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung und Optimierung einer Reaktion. Bei einer biologischen Reaktion hängt die Aktivität, aber auch die Stabilität der Zellen von der Temperatur ab. In Schüttelkolbenversuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungstemperaturen auf die Aktivität der immobilisierten Zellen untersucht.

Die während der Versuche eingestellten Temperaturen betrugen zwischen 20°C und 42°C. Es wurde festgestellt, dass eine Steigerung der Temperatur von 20°C auf 37°C zu einer 35-fachen Erhöhung der Itaconsäureproduktion führt (Abb. 6-23).

Als Erklärung für das beobachtete Temperaturverhalten kann allgemein eine Steigerung der Aktivität des Enzym-pools der Zelle, der Reaktionsgeschwindigkeit angeführt werden. Zudem kommt es zu einer Erhöhung der Diffusionskoeffizienten innerhalb der Immobilisate, was zu einer besseren Versorgung der LentiKats® mit Substrat und einem besseren Abtransport der Nebenprodukte führen kann.

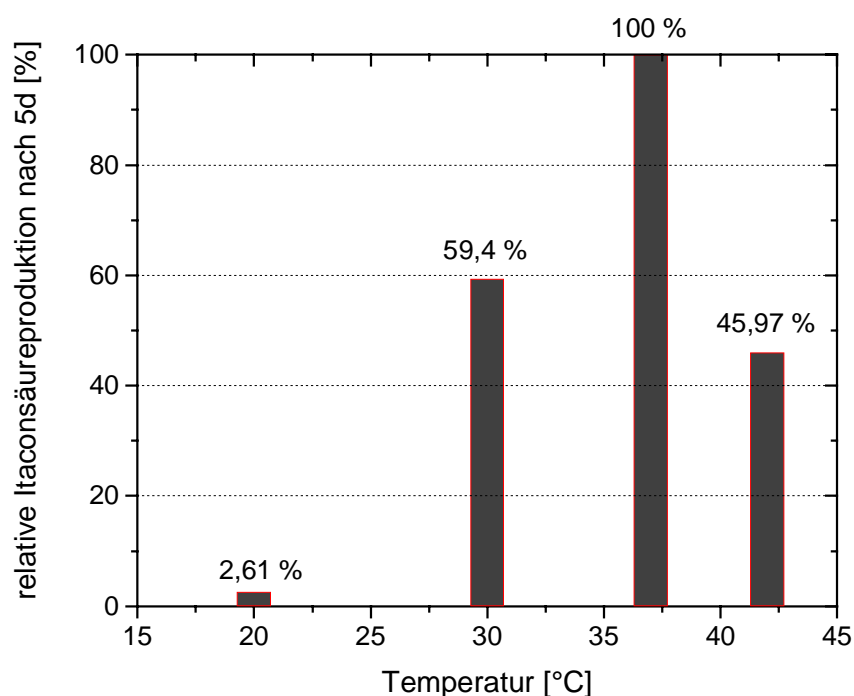


Abb. 6-23. *Itaconsäurebildung bei verschiedenen Temperaturen*

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	100 mL Standard-Produktionsmedium
	Immobilisatmenge:	2 g KFM / L
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	pH-Wert:	3.1

6.3.3.3 Einfluss der eingesetzten Immobilisatmenge bei LentiKats®

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Mengen an Immobilisat von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 durchgeführt. Dazu wurden 0,2, 0,8 und 1,4 g des Katalysators in jeweils 100 mL Medium eingesetzt. Die Abbildung 6-24 zeigt, dass die Produktivität nicht proportional zur Katalysatormenge ansteigt. Die spezifische Katalysatoraktivität nimmt mit zunehmendem Katalysatorvolumen ab. Durch die Immobilisierung der Biomasse liegt eine höhere Biomassekonzentration als beim Einsatz freier Zellen vor. Dieses Verhältnis kann durch die Erhöhung des Immobilisatanteils im Reaktor weiter erhöht werden, was zu gesteigerten Produktivitäten führen sollte. Ein deutliches Zeichen für eine externe Transportlimitierung ist eine scheinbare Erhöhung der Katalysatoraktivität nur durch Reduktion der Katalysatormenge bei sonst gleichen Versuchsbedingungen. Beim Einsatz von LentiKats® zeigte sich (wie auch bereits im Kapitel 6.3.3.1 festgestellt) eine ausgeprägte Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der eingesetzten Immobilisatmenge.

Mit zunehmendem Katalysator-Anteil am Reaktionsvolumen nahm die spezifische Aktivität des Biokatalysators ab. Das weist darauf hin, dass die Zellen im Versuchsansatz einer Limitierung unterlagen.

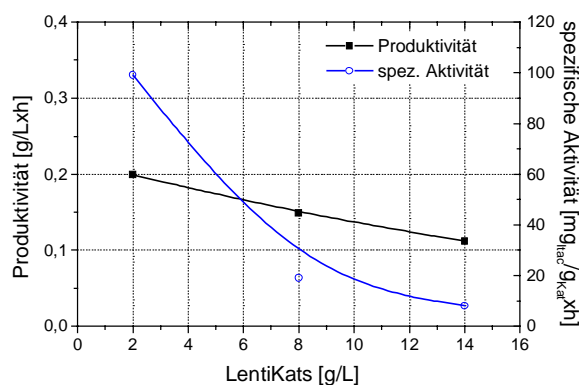


Abb. 6-24. Produktivitäten und spezifische Aktivitäten bei unterschiedlichen Katalysatorkonzentrationen

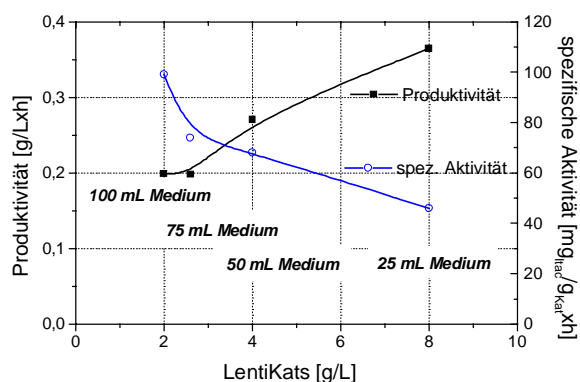


Abb. 6-25. Produktivitäten und spez. Aktivitäten bei unterschiedlichen Katalysatorkonzentrationen und unterschiedlicher Sauerstoffzufuhr (V_R 25-100mL)

Bedingungen: 250mL Erlenmeyerkolben 3 Schikanen
 100mL Standard-Produktionsmedium
 Immobilisatmenge: 2-14 g KFM/L
 Substrat: 70 g/L Glucose
 Schüttlerfrequenz: 120 Upm
 Temperatur: 37°C
 pH-Wert: 3.1

Bedingungen: 250mL Erlenmeyerkolben 3 Schikanen
 25-125mL Standard-Produktionsmedium
 Immobilisatmenge: 2-8 g KFM/L
 Substrat: 70 g/L Glucose
 Schüttlerfrequenz: 120 Upm
 Temperatur: 37°C
 pH-Wert: 3.1

Ein Grund für unser Ergebnis ist in einer Limitierung zu suchen, die erst bei genügend hohen Katalysatormengen und den damit einhergehenden Biomasse-Gehalten sichtbar wird. Eine Limitierung durch ein extremes Absinken des pH-Wertes kann ausgeschlossen werden, da sich zeigte, dass sich der pH-Wert immer auf einen pH-Wert um 2 einpegelte, unabhängig von der Katalysator- und Produktkonzentration.

Möglich ist, dass der notwendige Sauerstoff unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichend war. Der Sauerstoffzufuhr kommt bei der strikt aeroben Produktion von Itaconsäure eine besondere Bedeutung zu. Da *Aspergillus terreus* keine Möglichkeit zum anaeroben Stoffwechsel besitzt, müssen die in der Glykolyse und im TCC gebildeten Reduktionsäquivalente in der Atmungskette unter aeroben Bedingungen regeneriert werden.

Um den Einfluss des Sauerstoffs beurteilen zu können, wurde der Versuch der Abbildung 6-24 erneut durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, dass das Reaktionsvolumen im Verhältnis zur Beladung gesenkt wurde. Damit wird mit steigender Katalysatorbeladung die Sauerstoffversorgung verbessert. Mit der Senkung des Reaktionsvolumens im 250 mL-Erlenmeyerkolben von 100 mL auf bis zu 25 mL muß in diesen Versuchen der Einfluss der Verdunstung, vor allem bei weniger als 50 mL Reaktionsvolumen berücksichtigt werden. Hierzu wurde in einem Parallelversuch der Einfluss der Verdunstung bestimmt. Die sich aus der Abbildung 6-26 durch Verdunstung ergebenden Werte wurden bei den Berechnungen in den Abbildungen 6-25 und 6-27 berücksichtigt.

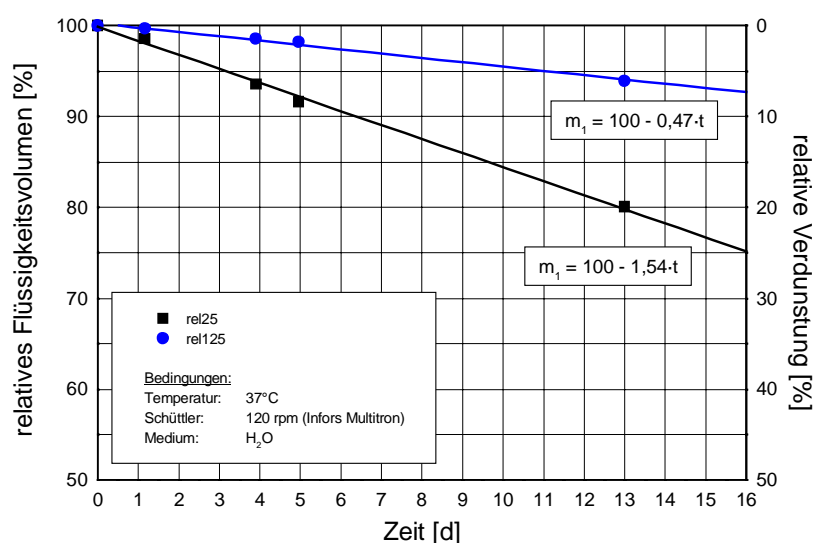


Abb. 6-26. Verdunstung während der Schüttelkolbenversuche

Aus der Abbildung 6-25 wird deutlich, dass die Produktivität bei einer verbesserten Sauerstoffversorgung (realisiert durch die Verringerung des Reaktionsvolumens) proportional zur Katalysatormenge ansteigt und nicht mehr wie in der Abbildung 6-24 proportional zur Katalysatormenge absinkt.

Desweiteren wurde festgestellt, dass das deutliche Zeichen der externen Transportlimitierung aus der Abb. 6-24 (die scheinbare Erhöhung der Katalysatoraktivität nur durch Reduktion der Katalysatormenge) mit abnehmendem Reaktionsvolumen tendenzell abnahm. Der limitierende Schritt aus der Abb. 6-24 lag in einer Sauerstofflimitierung.

Um diesen Sachverhalt zu untermauern, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, bei denen zum einen 0,8 g LentiKats® in 100 mL Medium (Beladung 8 g_{KFM}/L) und zum anderen 0,2 g LentiKats® in 25 mL Medium (ebenfalls Beladung 8 g_{KFM}/L) inkubiert wurden (siehe Abb.6-27). Da beide Versuche im 250 mL Erlenmeyerkolben bei gleicher Rotationsschüttelfrequenz (120 Upm) durchgeführt wurden, war im Erlenmeyerkolben mit 25 mL Reaktionsvolumina, durch die Vergrößerung der Oberfläche und den stärkeren Einfluss der 3 Schikanen ein höherer Sauerstoffeintrag als im Erlenmeyerkolben mit 100 mL Reaktionsvolumina gegeben.

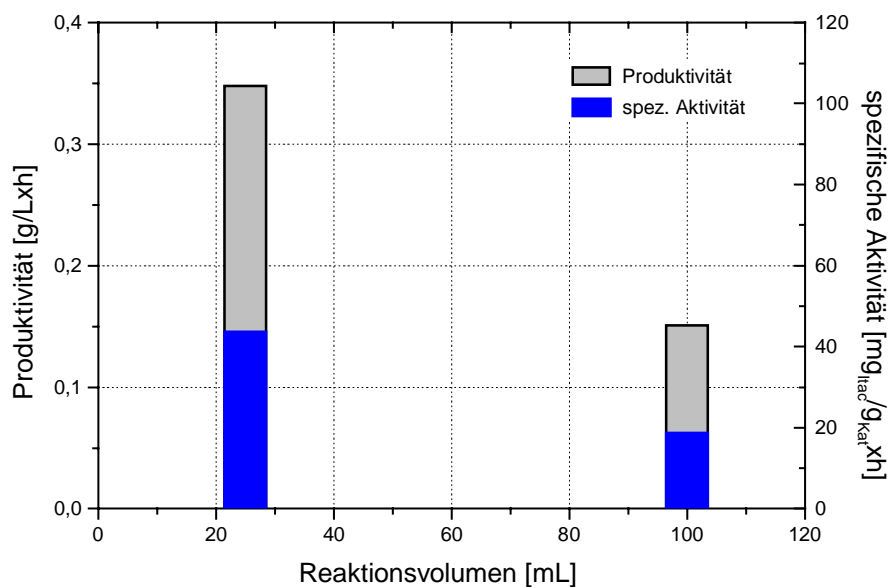


Abb. 6-27. Produktivitäten und spezifische Aktivitäten nach 5 d Inkubation bei gleicher Katalysatorkonzentration und unterschiedlicher Sauerstoffzufuhr ($V_R = 25$ und 100 mL)

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	25/100 mL Standard-Produktionsmedium
	Immobilisatmenge:	8 g KFM/L
	Substrat:	70 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Aus der Abbildung 6-27 wird deutlich:

bei gleicher Katalysatorbeladung steigt die spezifische Aktivität und die Produktivität durch Verbesserung der Sauerstoffzufuhr (in diesem Experiment realisiert durch die Verringerung des Reaktionsvolumens) auf das Doppelte an.

Nelson et. al. (1952) und Pfeifer et. al. (1952) stellten fest, dass ein die Ausbeute steigernder Effekt durch Beaufschlagung des Reaktors mit einem Überdruck von 0,6 bis 1 bar erfolgte. Durch einen erhöhten Gesamtgasdruck wird der Sauerstoffpartialdruck ebenfalls erhöht und führt wegen der Gleichgewichtseinstellung an der Phasengrenze Gas / Flüssigkeit zu einer größeren Löslichkeit des Sauerstoffs in der flüssigen Phase und somit zu einer verbesserten Versorgung der Zellen. Nelson et. al. (1952) und Pfeifer et. al. (1952) stellten weiterhin fest, dass die Itaconsäureausbeute oberhalb eines Sauerstoffpartialdrucks in der Gasphase von 0,16 bar bei einem Gesamtdruck von 1,013 bar kontinuierlich abnimmt.

Auch bei Yahiro et al. (1997) und Kobayashi & Nakamura (1966) wurde ein deutlicher Produktionsabfall von Itaconsäure bei zu hoher Sauerstoffversorgung festgestellt und auf die mögliche Toxizität des als Radikal aufzufassenden molekularen Sauerstoffs zurückgeführt. Kobayashi & Nakamura (1996) machten desweiteren die Beobachtung, dass ein optimales Mycelwachstum bei einem Partialdruck von 0,2 bar stattfand.

Beobachtungen zum Mycelwachstum:

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zum Einfluss des Sauerstoffeintrages auf das Mycelwachstum und die Itaconsäureproduktion wurden Beobachtungen zu einem veränderten Mycelwachstum bei unterschiedlicher Sauerstoffversorgung gemacht. Es wurde beobachtet, dass ein hoher Sauerstoffeintrag auch zu einem verringerten Wachstum der Biomasse führte und somit das Auswachsen aus den Immobilisaten entschieden vermindert werden konnte.

Der komplexe Regulationsmechanismus des Sauerstoffs bei der Itaconsäureproduktion wird noch wenig verstanden. Im Kapitel 6.3.3.6 (kontinuierliche Fermentation mit LentiKats®) wird weiterhin auch auf die äußerst negative Auswirkung einer Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr auf die Itaconsäureproduktion eingegangen. Alle Ergebnisse dieses Kapitels machen deutlich, dass der Sauerstoffzufuhr während der Itaconsäureproduktion eine besondere Bedeutung zukommen muss. Da während dieser Arbeit alle Versuche zum Sauerstoffeinfluss leider nur im Schüttelkolben durchgeführt werden konnten, diese Art der Versuchsdurchführung jedoch Grenzen allein durch die Variation der Beladung und Sauerstoffzufuhr gesetzt sind, sollten in folgenden Arbeiten weitere Versuche zum Sauerstoffeinfluss durchgeführt werden.

6.3.3.4 Einfluss der Lagerung auf die Itaconsäurebildung in LentiKats®

Die Lagerfähigkeit der Immobilisate ist ein wichtiges Kriterium für den späteren Anwendungsfall. Die Lagerung sollte keine hohen Kosten verursachen und hohe Aktivitäten nach der Lagerung gewährleisten. Nachdem 12 g LentiKats® zweimal in 100 mL B&S-Produktionsmedium im Repeated-Batch-Ansatz eingesetzt wurden, sind sie ca. 12 Wochen bei 4°C im Kühlschrank im Minimal-Produktionsmedium in geschlossenen Duran-Schottflaschen gelagert worden. Der Katalysator wurde anschließend erneut eingesetzt. Da der erneute Einsatz der LentiKats® (4.-6. Batch) nach den Optimierungsversuchen zum Medium und zur Katalysatormenge erfolgte, wurde die Repeated-Batchversuche nach der Lagerung mit 2 g LentiKats® in Standard-Produktionsmedium durchgeführt. Die Abbildung 6-28 zeigt die Reaktivierung nach 12 Wochen Lagerung. Eine dreimonatige Lagerung von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 bei 4°C im Minimal-Produktionsmedium war ohne Aktivitätsseinbußen möglich. Wie aus der Abbildung 6-28 ablesbar, konnten mit den neuen Versuchsbedingungen (wie schon in den Versuchen der Abbildung 6-22) spezifische Aktivitäten bis zu 150 mg_{Itac}/g_{Kat}·h erreicht werden.

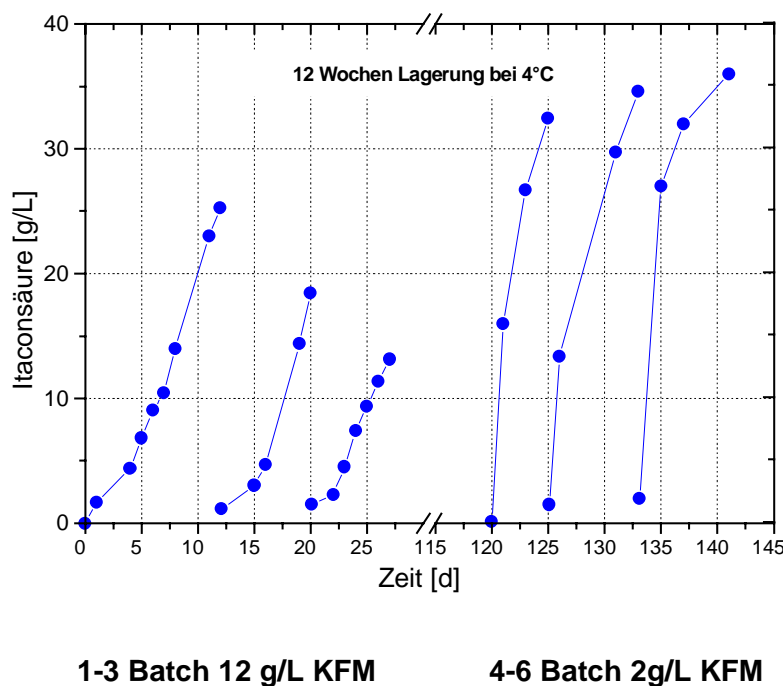


Abb. 6-28. Itaconsäurebildung nach 3 Monaten Lagerung der LentiKats®

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	1-3 Batch 100 mL B&S-Produktionsmedium, 4-6 Batch 100 mL Standard-Produktionsmed.
	Substrat:	80 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

6.3.3.5 Untersuchungen zum Substrateinfluss

Für die Prozessführung bzw. Auswahl des Fermentationsverfahren ist es notwendig, die Abhängigkeit der Aktivität von der Substrat-Konzentration zu kennen. In Batch-Verfahren ist eine möglichst hohe Substratkonzentration wünschenswert, um bei gegebener Ausbeute eine maximal mögliche Produktkonzentration zu erzielen. Häufig treten jedoch Substrathemmungen auf, so dass nur mit Fed-Batch-Verfahren und kontinuierlichen Verfahren die Notwendigkeit geringer Substratkonzentrationen mit der Notwendigkeit einer hohen Produktkonzentration in Einklang zu bringen ist. Grundlegende Kenntnisse zur Abhängigkeit der Itaconsäureproduktion der eingeschlossenen Mikroorganismen von der Substrat- und Produktkonzentration sind für die Auslegung des Prozesses und des Immobilisates von entscheidender Bedeutung. Für diese Untersuchungen wurden in LentiKats® immobilisierte Zellen von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in 250 mL Schüttelkolben mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen inkubiert (Abb. 6-29).

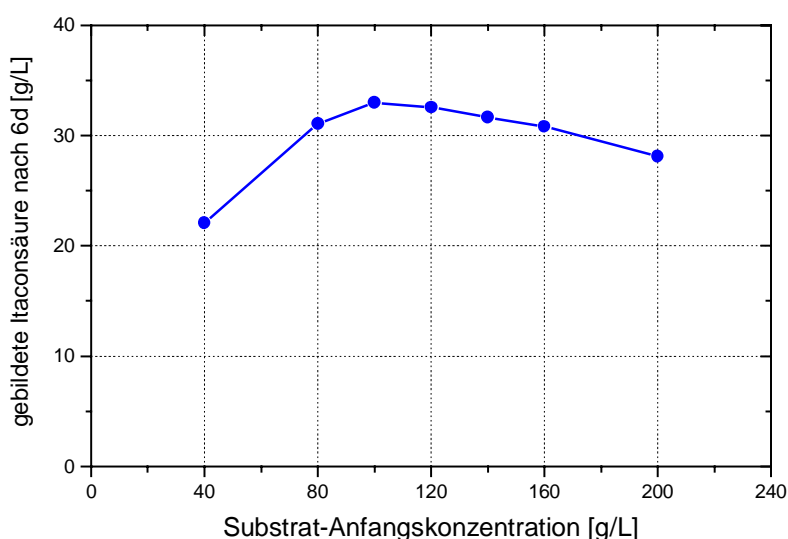


Abb. 6-29. Einfluss der Substratkonzentration

Bedingungen:	Reaktor:	250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen
	Medium:	25 mL Standard-Produktionsmedium
	Immobilisatmenge:	8 g KFM / L
	Substrat:	40-200 g/L Glucose
	Schüttlerfrequenz:	120 Upm
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Die spezifischen Aktivitäten bleiben bei einer Katalysatorbeladung von 8 g KFM/L mit 80 bis 200 g/L Glucose über den gesamten Zeitraum auf nahezu konstantem Niveau von ca. 45-55 mg_{Itac}/g_{Kat}·h. Freie Zellen von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 weisen ein Optimum der Aktivität bei 80-160 g/L Glucose auf und zeigen einen starken Einbruch der Aktivität (s. Abb.5-24 im Kapitel 5.4.7) bei Glucosekonzentrationen ab 180 g/L.

Für immobilisierte Zellen ist dagegen eine Ausdehnung des Optimums in den Bereich höherer Substratkonzentrationen zu beobachten. Dies kann durch einen Diffusionsgradienten, der sich im Katalysator bei hohem Substratverbrauch aufbaut, erklärt werden. Der Gradient wird durch den Transportwiderstand der Gelmatrix hervorgerufen, im höheren Maße jedoch durch die Aktivität der Zellen und durch Diffusionswiderstände der Kolonien selbst verursacht. Wijffels (1994) nimmt an, dass der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} eines Immobilisats proportional zur eingeschlossenen Biomasse abnimmt.

Da es sich bei dem eingesetzten Katalysator um einen nahezu homogen mit Kolonien gefüllten Biokatalysator handelt, wirkt sich eine hohe Substratkonzentration im umgebenen Medium positiv auf den internen Gradienten aus, d.h. er verläuft flacher und ermöglicht eine bessere Versorgung der Kolonien im Inneren des Katalysators. Der positive Aspekt der Aktivitätssteigerung kehrt sich erst dann um, wenn die Glucosekonzentration an der Oberfläche des Katalysators so groß ist, dass die oberflächennahen Kolonien einer Substratlimitierung unterliegen.

6.3.3.6 Kontinuierliche Fermentation von immobilisiertem *Aspergillus terreus* NRRL 1963 in LentiKats® im 0,5-L- Fermenter

Die kontinuierliche Fermentation besitzt gegenüber Batch- und Repeated-Batch-Verfahren den Vorteil der gleichbleibenden Prozessbedingungen, sobald ein steady state (Fließgleichgewicht) erreicht ist. Zum Test der Immobilisate wurde ein 0,5-L-Glasreaktor mit einem Magnetrührer verwendet (s. Kap. 4.5.3). Das System bestand aus einem Kulturgefäß, in das aus zwei Vorratsgefäßen Nährlösung mit konstanter Zuflussrate einfließt. In unserem Fall wurde eine unsterile Lösung der Nährsalze mit einer hochkonzentrierten Glucoselösung vermischt und in den Reaktor gepumpt. Durch Belüftung und mechanische Rührung wird im Kulturgefäß für eine Gaszufuhr und eine sofortige gleichmäßige Verteilung der in der zufließenden Nährlösung enthaltenen Nährstoffe gesorgt.

Es wurden zunächst die Bedingungen der Testansätze übernommen und an die veränderten Bedingungen angepasst. Anders als in den kleinen Testansätzen kann der pH-Wert und die Sauerstoffversorgung kontrolliert und geregelt werden. Es konnte ein konstanter Sauerstoffpartialdruck eingestellt werden. Die Fermentationstemperatur betrug 37°C. Der pH-Wert wurde bei 3.1 mit einer 4 molaren NaOH Lösung geregelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte leider keine Mediumoptimierung für das Konti-Fermentationsmedium erfolgen. Aus diesem Grund wurde bei der Zusammensetzung des Fermentationsmediums auf bereits verwendete Medien kontinuierlicher Fermentationen mit immobilisiertem *Aspergillus terreus* NRRL 1960 aus den Arbeiten von Kautola et al (1985) und von Ju & Wang (1986) zurückgegriffen (s. Tab. 4-8). Beide Arbeitsgruppen verzichteten jedoch auf die Zugabe von Zinksulfat und Calciumchlorid.

Über die Zugabe von Phosphat waren Sie unterschiedlicher Meinung. Während dem Medium von Kautola et al (1990) kein Phosphat zugefügt wurde, setzten Ju & Wang (1986) relativ hohe Konzentrationen an KH_2PO_4 (0,088 g/L) ein. Aufgrund eigener Erfahrungen der hier vorliegenden Arbeit (die Itaconsäurebildung des *Aspergillus terreus* NRRL 1963 erfolgt wachstumsentkoppelt durch Phosphatlimitierung, Phosphat < 0,8 mg/L) wurde dem Konti-Fermentationsmedium in dieser Arbeit 1 mg/L KH_2PO_4 zugefügt. Erfahrungen über eine kontinuierliche Zugabe dieser Phosphatmengen bei einer Itaconsäureproduktion lagen jedoch nicht vor.

Bei der Herstellung der LentiKats® für den Einsatz im 0,5-L-Fermenter wurde eine Sporensuspension mit 6×10^5 Sporen/mL verwendet. Die LentiKats® wurden im 0,5-L-Fermenter bei kontinuierlichem Betrieb kultiviert und bezüglich verschiedener Parameter charakterisiert. Dabei wurden etwa 55 mL LentiKats® in 280 mL Reaktionsvolumen eingesetzt (ca. 200 g/L KFM) und dabei erste Erfahrungen mit dem Konti-Betrieb gesammelt.

6.3.3.6.1 Einfluss der Verweilzeit

An eine Batch-Betriebsphase von 48 Stunden mit phosphathaltigem Wachstumsmedium (Tab. 4-5), die der Vermehrung der Pilzmasse innerhalb der Immobilisate diente, schloss sich die kontinuierliche Betriebsphase mit Konti-Fermentationsmedium (Tab. 4-9) an, die zunächst mit einer hohen Verdünnungsrate begonnen wurde. Für jeweils 5 Verweilzeiten wurden in der kontinuierlichen Fermentation drei Verdünnungsraten eingestellt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 6-30 dargestellt.

Mit dem vorhandenen System war es zwar möglich, die LentiKats® über einen Zeitraum von 6 Wochen ohne Zuwachsen des Fermenters stabil zu fahren, auch zeigten die LentiKats® über diesen Zeitraum hinweg keinen Abrieb, jedoch sind die erreichten Produktivitäten sehr gering. Wurden die Verdünnungsraten erhöht, sank der Glucoseverbrauch und die Itaconsäureproduktion. Hierfür müssen zwei Gründe genannt werden.

Da es sich bei dem verwendeten Medium um ein nicht optimiertes Medium für eine kontinuierliche Itaconsäureproduktion mit immobilisiertem *Aspergillus terreus* NRRL 1963 handelt, muss davon ausgegangen werden, dass verschiedene Mediumsbestandteile, wie z.B. das Phosphat im Medium, die Fermentation negativ beeinflussten. Eingangs wurde bereits erwähnt, dass keine Erfahrungen mit einer kontinuierlichen Zugabe von Phosphat vorliegen. Zu hohe Phosphatkonzentrationen hemmen den Itaconsäurebildungsprozess. Die Zugabe von 1 mg/L KH_2PO_4 könnte während der gesamten Fermentation zu hoch gewählt worden sein und sich somit hemmend auf die Itaconsäurebildung ausgewirkt haben. In folgenden Arbeiten müssen die Mediumsbestandteile im Konti-Fermentationsmedium optimiert werden. Für eine kontinuierliche Prozessführung muss vor allem die optimale Phosphatkonzentration ermittelt werden.

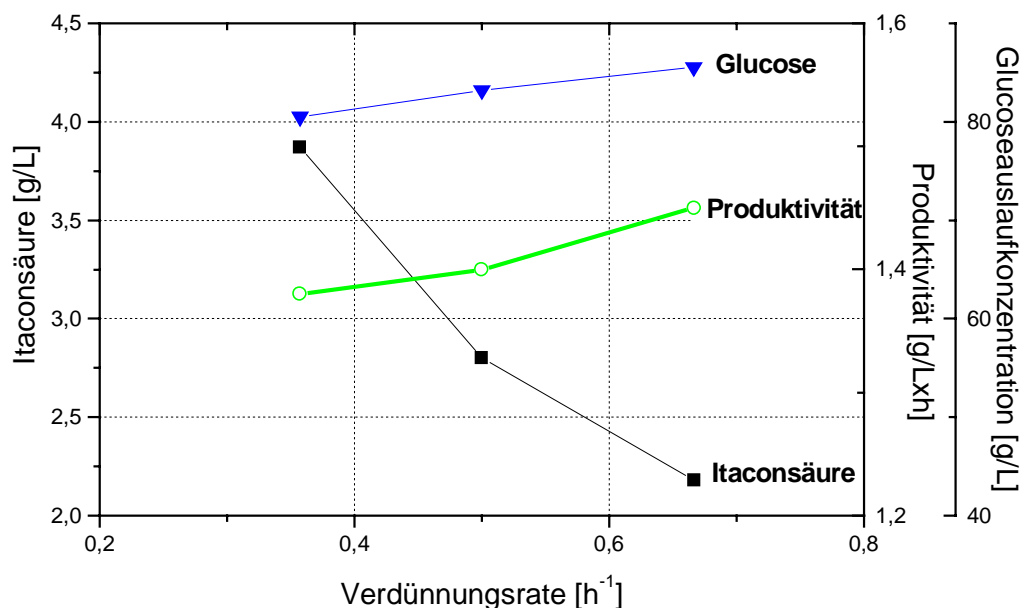


Abb. 6-30. *Itaconsäurekonzentration, Glucoseaufnahme und Produktivität für den immobilisierten Aspergillus terreus NRRL 1963 in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate während einer kontinuierlichen Fermentation*

Bedingungen:	Medium:	Konti-Fermentationsmedium
	Katalysatorbeladung:	30% LentiKats® mit 6×10^5 Sporen/mL
	Substrat:	90 g/L Glucoseanfangskonzentration
	Begasung:	kontinuierlich mit reinem Sauerstoff
		$p\text{O}_2 = 60\%$, Fluss 0,15 vvm
	Rührer:	Rührkern über Magnetrührer, 700upm
	Reaktionsvolumen:	280 mL
	Temperatur, pH-Wert:	37°C , 3.1, Einstellung mit 8M NaOH

Bereits im Kapitel 5.4.8 (Einfluss der Produktkonzentration auf den Itaconsäurebildungsprozess) wurde auf eine Produkthemmung hingewiesen. Da bei den niedrigen Verdünnungsraten höhere Produktkonzentrationen vorliegen, sinkt die Produktivität in diesen Bereichen ab, im Bereich hoher Verdünnungsraten steigt sie wieder an (s. Abb. 6-30). Beim Vorliegen einer Produkthemmung, wie bei der Itaconsäureproduktion, ist eine kontinuierliche Fermentation nicht geeignet, da bei einer effektiv geführten kontinuierlichen Fermentation (geringe Verweilzeiten) ständig erhöhte Produktkonzentrationen vorliegen, mit der Folge geringer Produktivitäten.

Bei der verwendeten Katalysatorbeladung von 30% konnte mit den gegebenen Bedingungen in kontinuierlicher Kultur bei einer Verdünnungsrate von $0,68 \text{ h}^{-1}$ eine maximale Produktivität von $1,47 \text{ g/Lxh}$ erzielt werden. Das ergab ca. 36 g Itaconsäure in 24 Stunden.

3.3.3.6.2 Einfluss einer Sauerstoffunterbrechung

Am 20. Tag trat während einer kontinuierlichen Fermentation ein Störfall in der Sauerstoffversorgung ein, der die Itaconsäureproduktion sehr stark beeinflusste. Die Sauerstoffzufuhr war für ca. 1 h unterbrochen. Nach dem Störfall in der Sauerstoffversorgung wurden ebenfalls Verweilzeiten von 0.35; 0.5; 0.68 h⁻¹ eingestellt.

Es wurden nach dem Sauerstoffstörfall wesentlich niedrigere Itaconsäureausproduktivitäten als in den vorhergehenden kontinuierlichen Fermentationen (s. Abb. 6-30) erreicht. Prinzipiell ergab sich das gleiche Verhalten (mit steigender Verdünnungsrate verringert sich die Itaconsäurekonzentration sowie der Glucoseverbrauch), die Itaconsäureproduktivität pendelt sich nach dem Störfall nur noch auf ½ der vorherigen Produktivitäten ein, was aus der Abbildung 6-31 deutlich wird. Der Prozess erholte sich auch nach längerer Laufzeit (20 Tage nach dem Störfall) nicht wieder.

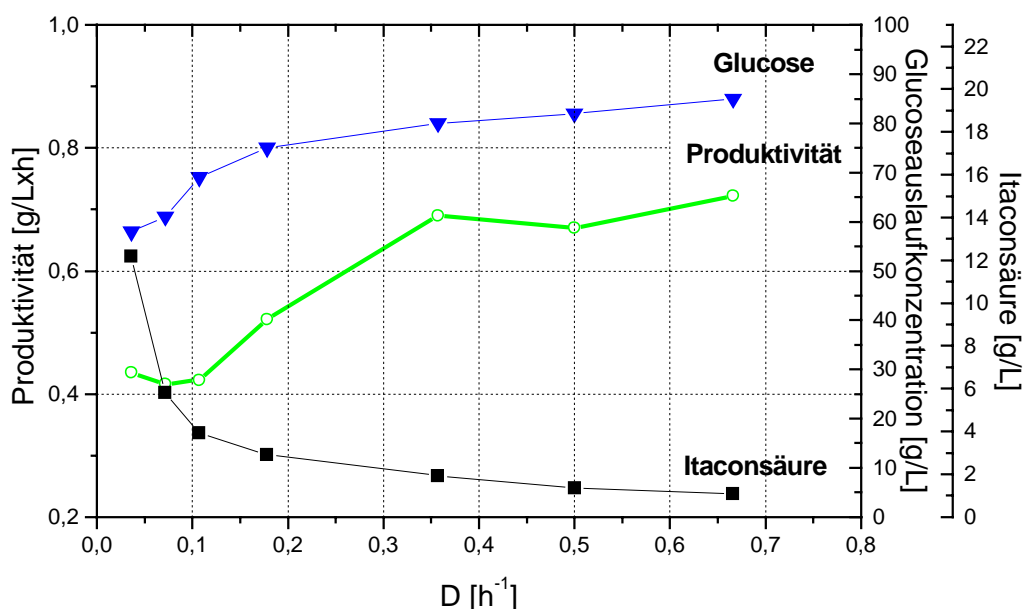


Abb. 6-31. Itaconsäurekonzentration, Glucoseaufnahme und Produktivität in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate während einer kontinuierlichen Fermentation nach 1h Unterbrechung in der Sauerstoffversorgung

Bedingungen:	Medium:	Konti-Fermentationsmedium
	Katalysatorbeladung:	30% LentiKats® mit 6x10 ⁵ Sporen/mL
	Substrat:	90 g/L Glucoseanfangskonzentration
	Begasung:	kontinuierlich mit Pressluft
		pO ₂ = 60%, Fluss 1,4 vvm
	Reaktionsvolumen:	280 mL
	Temperatur, pH-Wert:	37°C, 3.1

Der komplexe Regulationsmechanismus des Sauerstoffs bei der Itaconsäureproduktion wird noch wenig verstanden. Auf ein derartiges Verhalten nach einem Sauerstoffmangel während einer Itaconsäurefermentation wurde bereits in der Arbeit von Gyamerah (1995) hingewiesen. Eine Unterbrechung der Sauerstoffversorgung zeigt äußerst negative Auswirkungen auf die Itaconsäureproduktion. Gyamerah (1995a) fand heraus, dass schon eine 5 minütige Begasungspause den sofortigen Produktionsstop der Itaconsäure zur Folge hatte. Erst nach einer Regenerationszeit von 24 h war ein erneuter Beginn der Produktion zu beobachten, die aber selbst 72 h nach der Begasungspause nicht wieder die ursprünglichen Raten erreichte. Ähnliche Beobachtungen machten Nelson et al. (1952), bei denen die Unterbrechung der Begasung 15 Minuten dauerte.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für die Entwicklung und Etablierung eines kostengünstigen biotechnologischen Verfahrens zur industriellen Herstellung von Itaconsäure aus preisgünstigen nachwachsenden Rohstoffen unter Verwendung optimierter Prozessbedingungen und unter Verwendung eines optimierten Biokatalysators zu erarbeiten.

In einem durchgeführten Stammscreening wurden mit dem Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 auf verschiedenen Substraten die kürzesten lag-Phasen, sowie die höchsten Aktivitäten erreicht.

Im Hinblick auf spätere technische Anwendungen sind mit dem Stamm *Aspergillus terreus* NRRL 1963 Kohlenstoffquellen auf der Basis Nachwachsender Rohstoffe (Stärke, Glucosesirup, Glucose, Fructose, Saccharose, Inulin, Rapsöl, Glycerin) und Abfallprodukte der Landwirtschaft (Melasse, Sauermilchmolke) gescreent worden. Es wurden mit Saccharose und Glucose die besten Verhältnisse zwischen Itaconsäureproduktion und Preis erreicht. In Folgearbeiten sollten ausführliche Preisrecherchen zu den möglichen C-Quellen innerhalb u. außerhalb der EU durchgeführt werden. Beim Substrat Stärke wurde im Rahmen der Screeningversuche festgestellt, dass *Aspergillus terreus* NRRL 1963 zwar nicht in der Lage ist, Itaconsäure aus nativer Stärke zu bilden, jedoch bei eingangs im Medium vorhandener Glucose in der Lage ist, Enzyme zu bilden, die Glucose durch enzymatische Hydrolyse aus Stärke abspalten. Bei Verwendung von Stärke als C-Quelle kann so auf die Zugabe von amylolytischen Enzymen, welche die Stärke als C-Quelle in Form von Oligosacchariden dem Pilz zugänglich macht, verzichtet werden. Diese interessante Beobachtung sollte in künftigen Arbeiten eingehender untersucht und für eine industrielle Produktion optimiert werden.

Ein Schwerpunkt der Optimierungsversuche in Bezug auf ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Itaconsäureproduktion wurde auf die Optimierung der Medienzusammensetzung gelegt und lag bei der Untersuchung des Bedarfs an Spurenelementen und mineralischen Bestandteilen, die einen entscheidenden Einfluss auf Wachstum und Umsatz haben.

- Das vorliegende Stickstoff-/ Phosphatverhältnis im Medium hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Itaconsäurebildung und das Wachstum. Bei zu niedrigen Anfangskonzentrationen an NH_4NO_3 im Medium ($< 2 \text{ g/L}$) kam es, egal ob KH_2PO_4 im Medium enthalten war oder nicht, kaum zum Wachstum und nicht zur Itaconsäureproduktion. Das Gleiche galt für zu niedrige Anfangskonzentrationen an KH_2PO_4 ($< 40 \text{ mg/L}$). Die Itaconsäurebildung erfolgt wachstumsentkoppelt durch Phosphatlimitierung. Desweiteren wurde beobachtet, dass *Aspergillus terreus* NRRL 1963 Phosphat adsorbiert. Eine Erklärung hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden. Für eine genaue Definition der optimalen Phosphatkonzentration im Produktionsmedium für eine Itaconsäureproduktion

mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 sollten in zukünftigen Arbeiten die Ursachen für dieses Verhalten aufgeklärt werden.

- Der Einfluss der Spurenelemente Vanadium, Molybdän, Bor, Kalium, Kobalt, Aluminium, Kupfer, Mangan, Zink und Eisen wurde untersucht. Zur Gruppe der toxischen Elemente sind Vanadium und Molybdän zu zählen. Der Mangangehalt des Mediums hat einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie und die Itaconsäureproduktivität von *Aspergillus terreus* NRRL 1963. Dabei ist eine sehr niedrige Mangankonzentration von unter 10 µg/L für eine maximale Itaconsäureproduktion erforderlich. Ein niedriger Phosphatspiegel schützt vor der schädigenden Manganwirkung. Angesichts der Auswirkungen von Manganspuren im Bereich weniger µg/L beim Einsatz von Mediumskomponenten ist unbedingt auf die eventuell mit ihnen eingetragene Mangan-Kontamination zu achten; dies gilt insbesondere für Eisen(II)salze. Auch die Kohlenhydratquelle sollte ggf. einem Reinigungsschritt unterzogen werden. Genauso bedarf die Qualität des in einem technischen Prozess verwendeten Wassers der Beachtung.
- Zur Gruppe der Elemente, die sich in den getesteten Konzentration weder positiv noch negativ auf die Itaconsäureproduktion auswirkten, gehörten Kobalt, Bor, Aluminium und Kalium.
- Zur Gruppe der Elemente, die bei Zugabe bestimmter Konzentrationen einen fördernden Einfluss auf die Itaconsäureproduktion ausüben, gehören Zink, Kupfer und Eisen. Schon bei Zugabe geringer Eisenmengen war eine erhebliche Steigerung der Itaconsäureproduktion zu verzeichnen. Mit einer Konzentration von 1,5 mg/L Fe^{3+} konnten mit 120 g/L Saccharose Itaconsäurekonzentrationen von 58 g/L erzielt werden. Die Ausgewogenheit zwischen einerseits hohen Konzentrationen am Erdalkalimetall Calcium (10 g/L) und andererseits den Spurenelementen Zink und Kupfer (das optimale Zink/Kupfer-Verhältnis liegt bei 0,008 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ / 0,015 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) führte zu einer Wachstumsmorphologie des Pilzes, die einerseits als Voraussetzung für hohe Aktivitäten und Erträge ganz wesentlich ist, und andererseits zu einem geringen Auswachsen der Zellen. In diesem Bereich wurde eine kleine feste Pelletbildung festgestellt.

Desweiteren wurden Versuche zur Erfassung von Produkt- und Substrathemmungen durchgeführt. Freie Zellen von *Aspergillus terreus* NRRL 1963 weisen ein Optimum der Aktivität bei 80-160 g/L Glucose auf und zeigen einen starken Einbruch der Aktivität bei Glucosekonzentrationen > 180 g/L. Für immobilisierte Zellen ist dagegen eine Ausdehnung des Optimums in den Bereich höherer Substratkonzentrationen zu beobachten. Bei einer Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wurde eine Produkthemmung durch die Itaconsäure selbst festgestellt. Aufgrund der Problematik von Produkt- und Substrathemmung während der Itaconsäureproduktion ist der Batch- bzw. Repeated-Batch-Betrieb angezeigt. Im Anschluss an alle Optimierungsversuche freier Zellen wurden mit dem erarbeiteten optimierten Standard-Produktionsmedium und bei Verwendung optimaler Prozessparameter im 250 mL-Erlenmeyerkolben nach 8 d mit 80 g/L Glucose im Batch-Ansatz 49 g/L Itaconsäure gebildet. Die Produktivität in diesem unregelmäßigen Ansatz betrug 0,4 g_{Itac}/Lxh. Die Ausbeute betrug 86,15 [Mol %].

Durch eine Immobilisierung der Zellen kann ein besseres Biomasse-Handling (der filamentöse Pilz *Aspergillus terreus* NRRL 1963 ist schwer zu handhaben) und eine bessere Langzeitstabilität erreicht werden. Da die Bildung der Itaconsäure wachstumsentkoppelt erfolgt (Phosphatlimitierung $< 0,8 \text{ mg/L}$) eignet sich der Prozess besonders für eine Immobilisierung. Bei der Erarbeitung eines wirtschaftlich rentablen Verfahrens zur Itaconsäureproduktion war aus diesen Gründen die Immobilisierung des Pilzes ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine möglichst einfache, schnelle und preiswerte Herstellung der Zell-Immobilisate gelegt. Vier Trägersysteme zur Immobilisierung von Sporen des Pilzstammes *Aspergillus terreus* NRRL 1963 sind im Einschluss- sowie im Adsorptionsverfahren getestet worden.

- Ein großer Nachteil der Adsorptionsmaterialien Siliconträger und Sinterglas-Kugeln war, dass die Sporenmenge und -verteilung in den Immobilisaten nicht direkt beeinflusst und fixiert werden konnte, was dazu führte, dass es bei beiden Immobilisaten im Laufe von Repeated-Batch-Versuchen zu einem extremen Mycelrandwachstum kam. Es ist davon auszugehen, dass Sporen, die sich zu Beginn der Anwachsphase, bedingt durch zu geringe Kapillarkräfte, in einer für den Bewuchs der Immobilisate ungünstig hohen Konzentration im Randbereich des Trägermaterials anreicherten. Dadurch wurde ein starkes Randmycelwachstum verursacht. Die Katalysatorleistung verschlechterte sich im Laufe von Repeated-Batch-Versuchen bereits nach wenigen Wochen. Die Adsorptionsimmobilisierung bringt im Vergleich zu einer Itaconsäureproduktion mit nativen Mycelpellets kaum Vorteile, da es infolge stärkeren Randmycelwachstums zur Diffusionshemmung und nachfolgendem Absterben der Biomasse in den unteren Schichten kommt. Im Rührkessel würde es aufgrund der hohen Auswaschrates der immer stärker werdenden Randmycelschicht durch Desorption und Abrieb, nicht in dem gleichen Maße wie bei einer Fermentation mit freien Zellen, aber auch zu Rückhalteproblemen und Mycelbewuchs an Fermenterteilen kommen.
- Als zweites wurden zwei Einschluss-Immobilisate (PVAL) getestet. Der PVAL- und PEG-Gehalt der Matrix wurden im Hinblick auf das Wachstum und die Itaconsäurebildung optimiert. Für die Einschluss-Immobilisierung mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963 wird die Zusammensetzung von 10% (w/w) PVAL 17/99 und 6 % (w/w) PEG 1000 standardisiert. Ein großer Vorteil der Einschluss-Immobilisierung lag darin, dass die Sporenmenge und -verteilung in den Immobilisaten direkt beeinflusst werden konnte, was dazu führte, dass es zu keinem extremen Mycelrandwachstum bei den Einschluss-Immobilisaten kam. Die Sporen-Anfangsbeladung in Einschluss-Immobilisaten wurde optimiert und konnte auf eine Beladung von 6×10^5 Sporen/mL-Gel gesenkt werden.
- Die erzielten spezifischen Aktivitäten mit 2 g/L des Einschluss-Immobilisates PVAL-Cryogel-Perle lagen bei 30-40 $\text{mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}} \cdot \text{h}$. Mit PVAL-Cryogel-Perlen wurde auch nach über 50 Tagen Inkubation der Perlen kein Abfall der Aktivität der Perlen beobachtet. Der wesentliche Vorteil der Einschluss-Immobilisierung gegenüber der Adsorptions-Immobilisierung, der bessere Schutz der Mikroorganismen vor Abrieb und Desorption und der Einfluss auf die Biomasseverteilung (kein Randmycelwachstum), führte zwar zu einer längeren Prozessstabilität der Cryogel-Perlen, aber die durchschnittliche maximale

spez. Aktivität bei den verwendeten Cryogel-Perlen unterschied sich nicht wesentlich von denen der Adsorptionsimmobilisierung. Den Vorteilen der Einschluss-Immobilisierung stehen häufig eine geringere Aktivität der immobilisierten Biomasse und ein zusätzlicher Transportwiderstand durch die umgebende Gelmatrix als Nachteile gegenüber. Besonders intensiv wurde deshalb ein neues Verfahren für den Geleinschluss (LentiKats®) untersucht.

- Mit LentiKats® konnten bei einer Beladung von 2 g/L Immobilisat erheblich höhere maximale spezifische Aktivitäten ($100\text{--}130 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\text{h}$) als mit dem Einschluss-Immobilisat PVAL-Cryogel-Perlen erreicht werden. Die Ursache hierfür wird in der geringen Dicke der LentiKats® von 200-400 μm gesehen, durch die Diffusionslimitierungen innerhalb der Gelmatrix herabsetzt wurden. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich LentiKats® als die am besten geeignete Immobilisierungsmethode zur Itaconsäureproduktion. Die molare Ausbeute bezogen auf Glucose betrug im Batch-Ansatz 80 %. Legt man die in dieser Arbeit mit LentiKats® erzielten spezifischen Aktivitäten von ca. $100 \text{ mg}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\text{h}$ zugrunde, so wären bei einem im Rührkesselreaktor noch möglichen Einsatz von 250 g/L KFM spezifische Aktivitäten von ca. $25 \text{ g}_{\text{Itac}}/\text{g}_{\text{Kat}}\text{h}$ erreichbar. Zum Test der Immobilisate wurde ein 0,5-L-Glasreaktor mit einem Magnetrührer verwendet. Mit dem vorhandenen System war es möglich die LentiKats® über einen Zeitraum von 6 Wochen ohne Zuwachsen des Fermenters stabil zu fahren.

Der Sauerstoffzufuhr kommt bei der strikt aeroben Produktion von Itaconsäure eine besondere Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich bei hohem Sauerstoffeintrag nicht nur die Itaconsäureproduktion verbessert, sondern gleichzeitig auch das Auswachsen der Immobilisate verringerte. Eine Unterbrechung der Sauerstoffversorgung von nur wenigen Minuten zeigte äußerst negative Auswirkungen auf die Itaconsäureproduktion. In folgenden Arbeiten sollte auf diese wichtigen Beobachtungen näher eingegangen und für die Optimierung des Verfahrens genutzt werden.

Die Lagerung aller Immobilisate über mehrere Wochen in Minimal-Produktionsmedium bei 4°C beeinträchtigt die Aktivität nicht. Eine Steigerung der Prozesstemperatur von 20°C auf 37°C führte zu einer 35-fachen Erhöhung der Itaconsäureproduktion.

Mit der Immobilisierung entstehen zusätzliche Kosten für die Immobilisierung gegenüber der Itaconsäureproduktion mit freien Zellen. Die Materialkosten für PVAL sowie Zusatzstoffe liegen für LentiKats bei 0,60-1,00 DM/kg. In weiteren Arbeiten sollte noch geklärt werden, in welchen Mengen und auf welche Art die Sporen für einen technischen Prozess produziert werden müssen. Die Kosten zur Bereitstellung der Biomasse dürften aber gering sein, da es sich um eine Sporenimmobilisierung handelt.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Formeln

- **Abbildungen**

Einleitung:

- Abb. 1-1. *Strukturformel der Itaconsäure*
- Abb. 1-2. *Möglichkeiten der chemischen Synthese der Itaconsäure*
- Abb. 1-3. *Blase und Sterigmen des Aspergillus terreus NRRL 1963*
- Abb. 1-4. *Vorschlag der Biosynthese von Itaconsäure in Aspergillus itaenicus durch Kinoshita (1937) [nach Calam et al. 1939]*
- Abb. 1-5. *Schematische Darstellung des TCC mit dem Itaconsäurebiosyntheseweg nach Bentley & Thiessen 1957a,b, Winskill 1983 und Bonnarme et al. 1995*

Zellimmobilisierung:

- Abb. 3-1. *Immobilisierung von Zellen, Enzymen und Mikroorganismen*

Material und Methoden:

- Abb. 4-1. *Blockschaltbild der Ionenausschluss-HPLC*
- Abb. 4-2. *Beispielchromatogramm des UV-Kanals*
- Abb. 4-3. *Blockschaltbild des FI-Systems zum Ammoniumnachweis*
- Abb. 4-4. *Blockschaltbild des HPLC-Systems für die Nitratanalytik*
- Abb. 4-5. *Ergebnisse des Phosphattest nach John (1970) bei Standardaddition versch. Phosphatmengen zu Fermentationsproben unterschiedlicher Zeitpunkte*
- Abb. 4-6. *Schematische Darstellung der Immobilisierungsapparatur*
- Abb. 4-7. *Cryogelierte PVAL-Perlen*
- Abb. 4-8. *LentiKats®*
- Abb. 4-9. *1,8- L-Rührkesselfermenter zur Fermentation von freien Zellen*
- Abb. 4-10. *Schematisch Darstellung 1,8 L-Rührkesselfermenter*
- Abb. 4-11. *1,8 L-Rührkesselfermenter für die kontinuierlicher Betriebsweise mit freien Zellen*
- Abb. 4-12. *Kontinuierliches Fermentersystem*

Itaconsäureproduktion mit freien Zellen:

- Abb. 5-1. *Stammscreening mit Glucose als C-Quelle*
- Abb. 5-2. *Stammscreening mit Saccharose als C-Quelle*
- Abb. 5-3. *Stammscreening mit Glycerin als C-Quelle*
- Abb. 5-4a. *Itaconsäurebildung und Abbau von Glucosesirup hoher Verzuckerung (Cerestar Sweet D 02665)*

- Abb. 5-4b. *Itaconsäurebildung und Abbau von Glucosesirup niederer Verzuckerung (Cerester Sweet 01127)*
- Abb. 5-5. *Substratvergleich mit Aspergillus terreus NRRL 1963*
- Abb. 5-6. *Batch-Fermentation im 1,8-L Fermenter mit Aspergillus terreus NRRL 1963*
- Abb. 5-7. *Veranschaulichung des Summierungserfahrens über die Fermentationszeit einer Batch-Fermentation im 1,8-L Fermenter (aufsummierte Menge an Kohlenstoff im Abgas)*
- Abb. 5-8. *Kohlenstoffbilanz über den Zeitraum der Batch-Fermentation im 1,8-L-Fermenter*
- Abb. 5-9. *Direkte Bestimmung von μ_{\max} mit Hilfe einer Regressionsgerade durch die Messpunkte der exponentiellen Wachstumsphase bei halblogarithmischer Auftragung*
- Abb. 5-10. *Bestimmung von μ_{\max} mit Hilfe einer an die Biomasseentwicklung angepassten logistischen Funktion*
- Abb. 5-11. *Sessiles Mycel nach 300 Stunden kontinuierlicher Fermentation*
- Abb. 5-12. *Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an NH_4NO_3 und KH_2PO_4 auf die Itaconsäureproduktion und das Biomassewachstum (dicker Pfeil entspricht dem optimalen Verhältnis zwischen Stickstoff und Phosphat)*
- Abb. 5-13. *Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4*
- Abb. 5-14. *Itaconsäurekonzentrationen bei Anwesenheit verschiedener Spurenelemente (Werte normiert auf Ansätze ohne zusätzliche Spurenelemente am jeweiligen Tag)*
- Abb. 5-15. *Itaconsäurekonzentration nach 4 d Inkubation in Abhängigkeit von zugesetzter Mangan- und Phosphatkonzentration*
- Abb. 5-16. *Itaconsäurekonzentrationen nach 23 d Inkubation in Abhängigkeit von zugesetzten Mangan- und Phosphatkonzentration*
- Abb. 5-17. *Unterschiedliche Mycelmorphologie bei verschiedenen Mangankonzentrationen, v.l.n.r. 1,12 mg/L Mn^{2+} , 0,112 mg/L Mn^{2+} , 0,011 mg/L, Mn^{2+} , 0 mg/L, Mn^{2+} ; Phosphatkonzentration bei allen drei Kolben 31 mg/L PO_4^{3-}*
- Abb. 5-18. *Lichtmikrosk. Aufnahme vom Randstück eines dichten, größeren Mycelpellet im Ansatz ohne Manganzugabe nach 2d Bebrütung, Markierung = 100 μm*
- Abb. 5-19. *Lichtmikrosk. Aufnahme vom fädigen, lockeren Mycel im Ansatz mit 1,12 mg/L Mn^{2+} nach 2d Bebrütung, Markierung = 100 μm*
- Abb. 5-20. *Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$*
- Abb. 5-21. *Einfluss verschiedener Anfangskonzentrationen an $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (beim dicken Pfeil trat kleine feste Pelletbildung auf)*
- Abb. 5-22. *Freies Mycel aus dem Ansatz mit 0,3 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ mit optimalem Zn/Cu-Verhältnis, Markierung = 100 μm*
- Abb. 5-23. *Freies Mycel aus dem Ansatz mit 10 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ mit optimalem Zn/Cu-Verhältnis, Markierung = 100 μm*

- Abb. 5-24. Einfluss der Substratkonzentration auf die Itaconsäureproduktion
- Abb. 5-25. Abhängigkeit der Itaconsäurebildung von einer zusätzlich zugesetzten Menge an Itaconsäure
- Abb. 5-26. Itaconsäureproduktion im Batch-Betrieb

Itaconsäureproduktion mit immobilisierten Zellen:

- Abb. 6-1. Mycelbewuchs im Siliconträger nach 5 d Anwachsphase im Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1 mm)
- Abb. 6-2. Adsorbierte Pilzkolonie (Pfeil) nach 5 d Anwachsphase (Markierung entspricht 100 μ m)
- Abb. 6-3. Itaconsäureproduktion mit Siliconperlen
- Abb. 6-4. Bewuchs der Siliconträger im Abstand von 14 Tagen (von rechts nach links) (Karo im Hintergrund = 1x1 mm)
- Abb. 6-5. Aufgeschnittener Siliconträger nach 56 Tagen Inkubation (Karo im Hintergrund = 1x1 mm)
- Abb. 6-6. Einfluss der Immobilisatmenge auf die Produktivität und spezifische Aktivität
- Abb. 6-7. Porengefüge im Material der Sinterglas-Kugeln (Markierung entspricht 100 μ m)
- Abb. 6-8. Bewuchs einer Sinterglas-Kugel nach 5 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund entspricht 100 μ m)
- Abb. 6-9. Itaconsäureproduktion mit Sinterglas-Kugeln
- Abb. 6-10. Nach sechs Tagen Inkubation bei 30°C gebildete Itaconsäuremengen bei Anwesenheit verschiedener PEG-Massen, normiert auf Ansätze ohne PEG-Zusatz (=100%)
- Abb. 6-11. Nach sechs Tagen gebildete Itaconsäurekonzentration bei Anwesenheit von 2 % (w/v) Mowiol® 10-98 (bezogen auf 30°C Ansätze)
- Abb. 6-12. Bewuchs der Cryogel-Perle nach 4 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1 mm)
- Abb. 6-13. Pilzbewuchs am Rand der Cryogel-Perle nach 4d Wachstumsmedium; Markierung 100 μ m
- Abb. 6-14. Geschnittene Cryogel-Perle nach 4 d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund entspricht 1x1 mm)
- Abb. 6-15. Wandlöcher auf der Cryogel-Perle nach 8 Wochen Inkubation (Karo im Hintergrund entspricht 1x1 mm)
- Abb. 6-16. Itaconsäureproduktion mit Cryogel-Perlen
- Abb. 6-17. Schematische Darstellung eines LentiKats®
- Abb. 6-18. LentiKats® mit unterschiedlicher Sporen-Anfangsbeladung nach 4d Wachstumsmedium (Karo im Hintergrund = 1x1 mm)
- Abb. 6-19. Einfluss der Sporenanfangsbeladung auf die Aktivität der Immobilisate nach Erreichen des Stady state nach 4 Inkubationen (insgesamt 45 Tagen)

- Abb. 6-20. *LentiKats® mit einer Beladung von 1×10^6 Sporen/mL-Gel nach 4 Wochen Inkubation (Karo im Hintergrund entspricht 1×1 mm)*
- Abb. 6-21 *Schematische Darstellung des Randwachstums in LentiKats*
- Abb. 6-22. *Itaconsäureproduktion mit LentiKats®*
- Abb. 6-23. *Itaconsäurebildung bei verschiedenen Temperaturen*
- Abb. 6-24. *Produktivitäten und spezifische Aktivitäten bei unterschiedlichen Katalysatorkonzentrationen*
- Abb. 6-25. *Produktivitäten und spez. Aktivitäten bei unterschiedlichen Katalysatorkonzentrationen und unterschiedlicher Sauerstoffversorgung (V_R 25-100 mL)*
- Abb. 6-26. *Verdunstung während der Schüttelkolbenversuche*
- Abb. 6-27. *Produktivitäten und spezifische Aktivitäten nach 5 d Inkubation bei gleicher Katalysatorkonzentrationen und unterschiedlicher Sauerstoffzufuhr (V_R =25 und 100 mL)*
- Abb. 6-28 *Itaconsäurebildung nach 3 Monaten Lagerung der LentiKats®*
- Abb. 6-29 *Einfluss der Substratkonzentration*
- Abb. 6-30. *Itaconsäurekonzentration, Glucoseaufnahme und Produktivität für den immobilisierten Aspergillus terreus NRRL 1963 in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate während einer kontinuierlichen Fermentation*
- Abb. 6-31. *Itaconsäurekonzentration, Glucoseaufnahme und Produktivität in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate während einer kontinuierlichen Fermentation nach 1h Unterbrechung in der Sauerstoffversorgung*

• Tabellen

Material und Methoden:

- Tab. 4-1. *Betriebsbedingungen der Ionenausschluss-HPLC*
- Tab. 4-2. *Betriebsbedingungen der Ammonium-HPLC*
- Tab. 4-3. *Betriebsbedingungen der Nitrat-HPLC*
- Tab. 4-4. *Medium zur Stammhaltung*
- Tab. 4-5. *Wachstumsmedium*
- Tab. 4-6. *Minimal-Produktionsmedium für freie Zellen nach Kautola (1990)*
- Tab. 4-7 *B&S-Produktionsmedium für freie Zellen nach Batty & Schweiger (1963)*
- Tab. 4-8. *Standard-Produktionsmedium für freie Zellen und immobilisierte Zellen*
- Tab. 4-9. *Konti-Fermentationsmedium für immobilisierte Zellen*
- Tab.4-10. *Verwendete Stammkulturen*

Itaconsäureproduktion mit freien Zellen:

- Tab. 5-1. *Übersicht über veröffentlichte Batch-Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit freiem A. terreus Mycel*
- Tab. 5-2. *Übersicht über veröffentlichte kontinuierliche und Repeated-Batch-Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit freiem A. terreus Mycel*

- Tab. 5-3. *Wachstum und Itaconsäurebildung auf Zucker und Alkoholen mit Aspergillus terreus NRRL 1960 in Schüttelkolbenkultur [Larsen, H. & Eimhjellen, K., 1955]*
- Tab. 5-4. *Konzentrationen und andere Betriebskennzahlen im Zu- und Ablauf*
- Tab. 5-5. *Verbindungen und Endkonzentrationen der untersuchten Spurenelemente*
- Tab. 5-6. *Einfluss verschiedener Parameter auf die Itaconsäureproduktion*
- Tab. 5-7. *Vor- und Nachteile eines Batch-Betriebes für die Itaconsäureproduktion mit Aspergillus terreus NRRL 1963*

Itaconsäureproduktion mit immobilisierten Zellen:

- Tab. 6-1. *Übersicht über veröffentlichte Fermentationen zur Itaconsäureproduktion mit Aspergillus terreus in kontinuierlicher oder Repeated-Batch-Betriebsweise mit immobilisierten Zellen (Erläuterungen S. 86)*

8.2 Abkürzungen und Formelzeichen

• Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABS	Absorption
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
CSTR	Kontinuierlicher Rührkesselreaktor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.C.	Enzym-Code
FIA	Fliessinjektionsanalyse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Itac	Itaconsäure
ICP-OES	induktiv gekoppeltes Plasma-optische Emissionsspektroskopie
IFO	Institute of Fermentation, Osaka, Japan
k.A.	keine Angabe
KTM	Katalysatortrockenmasse
KFM	Katalysatorfeuchtmasse
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NRRL	Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois
PAG	Poly(acrylamid)gel
PE	Poly(ethylen)

PEG	Poly(ethylenglycol)
PET	Poly(ethylenterephthalat)
PM	Produktionsmedium
PP	Poly(propylen)
PTFE	Poly(tetrafluorethylen), Teflon®
PVAL	Poly(vinylalkohol)
PUR	Polyurethan
pH	neg. dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RI	Lichtbrechungsindex
RNA	Ribonucleinsäure
TCC	Tricarbonsäurezyklus, Krebszyklus
upm	Umdrehungen pro Minute
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett
vvm	Volumen Begasung pro Reaktionsvolumen und Minute

- **Formelzeichen**

c	[mol/L]	Konzentration
m	[g]	Masse
M	[g/mol]	relative Molmasse
RZA	[g/(d x L)]	Raum-Zeit-Ausbeute
t	[h]	Zeit
μ	[1/h]	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
μ_{\max}	[1/h]	maximale spezifische Wachstumsrate
η	[-]	Katalysator-Ausnutzungsgrad
D	[h ⁻¹]	Verdünnungsrate

8.3 Bezugsquellen

- **Analytik**

Detektoren:	RID-6A, SPD-10AV, SPD-6AV, RF-10A von SHIMADZU EUROPA, Duisburg, LKB 2151 von LKB-BROMMA, Schweden
Pumpen:	LC-10AD, LC-10AT von SHIMADZU EUROPA, Duisburg; M300C von GYNKOTEK, München
Ofen:	CTO-10A von SHIMADZU EUROPA, Duisburg
Autosampler:	Promis, Basic Marathon von SPARK HOLLAND, Emmen, Niederlande; SIL-10A von SHIMADZU EUROPA, Duisburg
Auswertung:	Class LC-10 System, C-R6A von SHIMADZU EUROPA, Duisburg
Photometer:	550 SE von PERKIN ELMER, Langen
HPLC-Säulen:	HPX87H von BIORAD, München; für Nitratanalytik von CHROMATOGRAPHIE SERVICE; Langerwehe

- **Fermentation 1,8-L-Fermenter**

Fermenter:	SET2C von SETRIC GÉNIE INDUSTRIELLE, Toulouse, Frankreich
pH-Elektroden:	Xerolyt® von METTLER TOLEDO, Steinbach/Ts.
O ₂ -Elektrode:	INGOLD, Steinbach/Ts.
Regelungseinheit:	MOD7F von SETRIC GÉNIE INDUSTRIELLE, Toulouse, Frankreich
Pumpen:	P7VV von SETRIC GÉNIE INDUSTRIELLE, Toulouse, Frankreich; 101U von WATSON-MARLOW, Falmouth, England; 503U von VERDER, Düsseldorf; Eigenbau des INSTITUTS FÜR TECHNOLOGIE DER FAL, Braunschweig
Dosierregler:	YFC02Z von SARTORIUS, Göttingen
Waage:	I 6800 von SARTORIUS, Göttingen
Flowmeter:	D10A3239N, D10A3239SN10 von FISCHER+PORTER, Göttingen
Begasungsventil:	EVG von SETRIC GÉNIE INDUSTRIELLE, Toulouse, Frankreich
Thermostate:	F25 von JULABO, Seelbach
CO ₂ -Messgerät:	Unor6N von MAIHAK, Hamburg
Dokumentation:	Punktdrucker Serie LD von LINSEIS, Selb

- **Stammhaltung und mikrobiologische Arbeiten**

Brutschrank:	HT INFORS, Bottmenden, Schweiz
Autoklav:	FEDEGARI AUTOCLAVI, Albuzzano, Italien
Zentrifuge:	Varifuge 20RS mit Rotor HFA 22.50 von HAEREUS; Hanau
Laborzentrifuge:	Centrifuge 5417 von EPPENDORF, Hamburg

- **Mikroskopie**

Mikroskop:	Axioplan mit Fotoeinheit MC 100 von CARL ZEISS, Oberkochen
Stereomikroskop	Stereomikroskop SV8 von CARL ZEISS, Oberkochen

- **sonstige Geräte**

Homogenisator:	Ultra-Turrax T50 mit Scherkopf S50N-G40G von IKA®-Labortechnik Jahnke & Kunkel, Staufen
Vakuum-Filtrationsg.:	Edelstahl Typ MV050/0 von SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel
Mikrowellengerät:	MicroChef FM3811 von MOULINEX, Solingen

- **Chemikalien**

Alle Chemikalien stammen, soweit hier nicht aufgeführt, in p.a. Qualität von E. MERCK, Darmstadt.

Chemikalie	Bezugsquelle
Ammoniummolybdat	SERVA, Heidelberg
Borsäure	RIEDEL DE HAËN, Hannover
Carbol-Fuchsin-Lösung	FLUKA, Neu-Ulm
Itaconsäure	ROTH, Karlsruhe
Kaliumsulfat	ALDRICH, Steinheim
Mowiol® 17-99	HOECHST, Frankfurt a.M.
PEG	HOECHST, Frankfurt a.M.
Salzsäure	RIEDEL DE HAËN, Hannover
Schwefelsäure	RIEDEL DE HAËN, Hannover
Siliconöl AK 10	WACKER CHEMIE, München

- **Laborbedarf**

pH-Messstreifen:	Acilit® 1-6 von E: MERCK, Darmstadt
Celluloseacetat-Filter (450 nm):	11306-25-N von SARTORIUS, Göttingen
Papier-Vorfilter:	SM13400 von SARTORIUS, Göttingen
Einmalsterilfilter (200 nm):	SM 16527 von SARTORIUS, Göttingen
PA-Filter zur BTM-Bestimmung:	Sartolon 25006-4/N von SARTORIUS, Göttingen

- **Mikroorganismen**

Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM), Braunschweig
Northern Regional Research Laboratory (NRRL) U.S.

- **als C-Quellen wurden verwendet:**

Glucose (Merck 1.08337)
Saccharose (Merck Nr. 1.07687)
Inulin (Dahlia tubers, Fluka Bio Chemika Nr. 57614)
Molkepulver (Satro Tk 10, Milchwerk Lippstadt)
raffiniertes Rapsöl (Dt. Cargill GubA)
Stärke (Merck Nr. 1252)
Zuckerrübenmelasse (Zuckerinstitut Braunschweig)

9.4 Literaturverzeichnis

- Anonymus (1970): The Mysterious Sulfopolycarboxylic Acid Detergent, Citrex; *Chemical Week* 107 (23), S. 35
- Anonymus (1986): Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, 22.05.1986; *BGBI.* I, S. 760-773
- Ariga, O., Takagi, H., Nishizawa, H., Sano, Y. (1987): Immobilization of microorganism with PVA hardened by iterative freezing and thawing, *J. Ferment. Technol.*, 65, S. 651-658
- Arpai, J. (1958): Itaconic Oxidase : An Enzyme from an Ultraviolet Induced Mutant of *Aspergillus terreus*; *Nature* 182, S. 661-662
- Auling, G. (1994): Manganese: Function and Transport in Fungi; in: Winkelmann, G., Winge, D.R., (Hrsg.): *Metal Ions in Fungi*, Marcel Dekker, New York, S. 215-236
- Auslegungsschrift der Bundesrepublik Deutschland 1 219 430 (1966)
- Bagavant, G., Gole S.R., Joshi V.W. und Soni S.B (1994): Studies on antiinflammatory and analgesic activities of itaconic acid systems Part 1: Itaconic acids and diesters. *Ind. J. Pharm. Sci.* 56, 3, S. 80-85
- Batti, M., Schweiger, L.B., Elkhart Ind. (1963): Process for the Production of Itaconic Acid; *US Patent* 3.078.217
- Batzer, H. (1984): Polymere Werkstoffe; Thieme, Stuttgart, S. 376
- Baup, S. (1837): Über eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der PyrogenSäuren überhaupt; *Annales de Chimie et de Physique* 19, S. 29-38
- Bentley, R., Thiessen, C. P. (1957a): Biosynthesis of Itaconic Acid in *Aspergillus terreus*, 1. Tracer Studies with C14-labeled Substrates; *Journal of Biological Chemistry* 226, S. 673-687
- Bentley, R., Thiessen, C. P. (1957b): Biosynthesis of Itaconic Acid in *Aspergillus terreus*, 2. Early Stages in Glucose Dissimilation and the Role of Citrate; *Journal of Biological, Chemistry* 226, S. 689-701
- Bentley, R., Thiessen, C. P. (1957c): Biosynthesis of Itaconic Acid in *Aspergillus terreus*, 3. The Properties and Reaction Mechanism of *cis*-Aconitic-decarboxylase; *Journal of Biological Chemistry* 226, S. 703-720
- Benz, M., Scharf, K.-H., Weber, Th. (1997): Informationsatlas Nachwachsende Rohstoffe der C.A.R.M.E.N, Aulisverlag Deubner
- Berg, R.G. , Hetzel, D.S., Pfizer Inc. (1978): *US Patent* 4.100.179, zitiert in Tate (1981)
- Bettin, A., Hansen, J., Breford, J., Vorlop, K.-D. (1997): Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung poröser und hochelastischer Träger für die Biokonversion nach wachsender Rohstoffe in aeroben Prozessen, 1. Workshop Biokonversion nachwachsender Rohstoffe 30.06-01.07.97, Detmold, S. 41
- Bettin, A. (vorr. 2000): Dissertation TU Braunschweig in Vorbereitung

- Bigelis, R., Arora, D. K. (1992): Organic Acids of Fungi; in: Arora, D. K. , Elander, R.P., Mukerji, K.G. (Hrsg.): *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 4: *Fungal Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, S. 357-376
- Bio-Rad (1995): Guidelines for Use and Care of Aminex[®] Resin-Based Columns; Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, Hercules, LIT-42 REV B
- Blatt, A.H. (1943): *Organic Syntheses*; John Wiley & Sons, New York, Vol. II, S. 328, zitiert in Tate (1981)
- Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A.M., Role, C., Beloeil, J.C., Ducrocq, C. (1995): Itaconat Biosynthesis in *Aspergillus terreus*; *Journal of Bacteriology* 177 (12), S. 3573-3578
- Bruchmann, E.-E. (1963): Über Aconitat-Hydratase, ihre chromatographische Reinigung und einige Hemmstoffe des Enzyms; Habilitationsschrift an der Fakultät für Landbau der TU Berlin
- Calam, Christopher T., Oxford, A.E., Raistrick, H. (1939): The Biochemistry of Microorganisms; LXIII. Itaconic Acid, a Metabolic Product of a Strain of *Aspergillus terreus* *Biochemical Journal* 33, S. 1488-1495
- Cargill Corporation (1999): aktuelle Preisinformationen, abgerufen über die Homepage der Cargill Corporation
- Carlsson, M., Habenicht, C., Kam, L.C., Antal. M.J., Bian, N., Cunningham, R.J., Jones, M. (1994): Study of Sequential Conversion of Citric to Itaconic to Metacrylic Acid in Near-Critical and Supercritical Water; *Industrial and Engineering Chemistry Research* 33, S. 1989-1996
- Chang, H.N., Moo-Young, M. (1988): Estimation of oxygen penetration depth in immobilized cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, S. 107-112
- Chiusoli, G.P. (1962): Process for Preparing Itaconic Acid and 2,3-Butandienoic Acid; *US-Patent* 3.025.320
- Cocker, R. Greenshields, R.N. (1977): Fermenter Cultivation of *Aspergillus*; in: Smith, J. E., Pateman, J. A. (Hrsg.) : *Genetics and Physiology of Aspergillus*, Academic Press, London, S. 361-389
- Corzo, R.H., Tatum, E.L. (1953): Biosynthesis of Itaconic Acid; *Federation Proceedings* 12, S. 470, zitiert in Eimhjellen & Larsen (1955)
- P. Cros, D. Schneider (1989): produce de production d'acide itaconique, *Europäisches Patent Nr. 0 341 112 A1*
- Crueger, W., Crueger, A. (1989): *Biotechnologie, Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*; 3. Auflage, Oldenbourg, München, S. 140
- Dawson, M.W., Maddox, I.S., Brooks, J.D. (1989): Evidence for Nitrogen Catabolite Repression During Citric Acid Production by *Aspergillus niger* under Phosphate-Limited Growth Conditions; *Biotechnology and Bioengineering* 33, S. 1500-1504
- Eimhjellen, K.E., Larsen, H. (1955): The Mechanism of Itaconic Acid Formation by *Aspergillus terreus*, 2. The Effect of Substrates and Inhibitors; *Biochemical Journal* 60, S. 139-147

- Finkelstein, D.B., Bull, C. (Hrsg.) (1992): *Biotechnology of filamentous fungi, Technology and Products*; Butterworth-Heinemann, Stoneham, S. 317
- v. Fries, H. (1966): Verfahren zur fermentativen Herstellung von Itaconsäure durch submers-aerobe Schimmelpilzgärung; *Deutsches Bundespatent 1.290.430*
- Glusker, J.P. (1971): Aconitase; in Boyer, P.D. (Hrsg.): *The Enzymes*; Vol. 5, 3. Auflage, Academic Press, New York, S. 413-439
- Gosmann, B., Rehm, H.-J. (1988): Influence of growth behaviour and physiology of alginate-entrapped microorganisms on the oxygen consumption, *Appl. Mikrobiol. Biotechnol.*, 29, S. 554-559
- Goyal, S.S., Rains, D.W., Huffacker, R.C. (1988): Determination of Ammonium Ion by Fluorometry or Spectrophotometry after On-Line Derivatization with o-Phthalaldehyde; *Analytical Chemistry* 60, S. 175-179
- Gyamerah, M.H. (1995a): Factors Affecting the Growth Form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in Relation to Itaconic Acid Fermentation; *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, S. 356-361
- Gyamerah, M. H. (1995b): Oxygen Requirement and Energy Relations of Itaconic Acid Fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960; *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, S. 20-26
- Hartmeier, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren; Springer, Berlin; S. 14-51
- Hockertz, S., Plözig, J., Auling, G. (1987): Impairment of DNA Formation is an early Event in *Aspergillus niger* under Manganese Starvation; *Applied Microbiology and Biotechnology* 25, S. 590-593
- Hoechst (1991): Mowiol® Polyvinylalkohol; Marketing Kunstharze und Polymerisate, Hoechst AG, Frankfurt a.M.
- Horitsu, H., Takahashi, Y., Tsuda, J., Kawai, K., Kawano, Y. (1983): Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* Immobilized in Polyacrylamide Gels; *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18, S. 358-360
- Horitsu, H., Xiao, R., Nakamura, Y., Kawai, K. (1985): Some Factors Affecting Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* Cells Immobilized in Polyacrylamide Gels; *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University* 50, S. 179-183
- In Tech (1998): Produktinformation der Inland Technology Inc zu „Citrex™“ und „Citrex EB™“ im Internet unter Itaconsäure am 03.03.1998
- Iwata Chemical Co (1999): aktuelle Preisinformation, abgerufen über die Homepage der Iwata Chemical Co.
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., Scrutton, M. C. (1991): The Subcellular Organization of Itaconate Biosynthesis in *Aspergillus terreus*; *Journal of General Microbiology* 137, S. 533-539
- Jakubowska, J. (1977): Itaconic and Itatartaric Acid Biosynthesis; in Smith, J. E., Pateman, J.A. (Hrsg.): *Genetics and Physiology of Aspergillus*, Academic Press, London, S. 427-451
- Jandel, A. S. (1991): Dosieren-aber gravimetrisch; *Chemie-Technik* 20 (2), S. 30-31

- Jekel, M. (1999): Entwicklung von Trägerkatalysatoren für Biokatalysatoren, Dissertation TU-Braunschweig
- Jekel, M., Buhr, A., Willke, Th., Vorlop, K.-D. (1998) Neuartige Geleinschlussimmobilisate (LentiKats[®]) in der Biotechnologie, *Chem. Eng. Techn.* 70, S. 438-441
- John, M.K. (1970): Colorimetric Determination of Phosphorus in Soil and Plant Materials with Ascorbic Acid; *Soil Science* 109 (4), S. 214-220
- Ju, N., Wang, S. S. (1986): Continuous Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* Immobilized in a Porous Disk Bioreactor; *Applied Microbiology and Biotechnology* 23, S. 311-314
- Kane, J.H., Finlay, A.C., Amann, P.F. (1945): Production of Itaconic Acid; *US Patent* 2.385.283
- Kautola, H. (1990): Itaconic Acid Production from Xylose in Repeated Batch and Continuous Bioreactors; *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, S. 7-11
- Kautola, H., Rymowicz, W., Linko, Y.-Y., Linko, P. (1991): Itaconic Acid Production by Immobilized *Aspergillus terreus* with Varied Metal Additions; *Applied Microbiology and Biotechnology* 35, S. 154-158
- Kautola, H., Vahvaselkä, M., Linko, Y.-Y., Linko, P. (1985): Itaconic Acid Production by Immobilized *Aspergillus terreus* from Xylose and Glucose; *Biotechnology Letters* 7 (3), S. 167-172
- Kautola, H., Vassilev, N. Linko, Y.-Y. (1989): Itaconic Acid Production by Immobilized *Aspergillus terreus* on Sucrose Medium; *Biotechnology Letters* 11 (5), S. 313-318
- Kautola, H., Vassilev, N., Linko, Y.-Y. (1990): Continuous Itaconic Acid Production by Immobilized Biocatalysts, *Journal of Biotechnology* 13, S. 315-323
- Kinoshita, K. (1932): Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz, *Aspergillus itaconicus*; *Acta Phytochimica* 5, S. 271-287
- Kisser, M., Kubicek, C.P., Röhr, M. (1980): Influence of Manganese on Morphology and Cell Wall Composition of *Aspergillus niger* During Citric Acid Fermentation; *Archives of Microbiology* 128, S. 26-33
- Kobayashi, T., Nakamura, I. (1966): Dynamics in Mycelial Concentration of *Aspergillus terreus* K26 in Steady State of Continuous Culture; *Journal of Fermentation Technology* 44, S. 264-274
- Kokofuta, E., Suzuki, S. Nakamura, I. (1988): Flocculation of *Aspergillus terreus* with Polyelectrolyte Complex and Production of Itaconic Acid with the Flocculated Mycelia; *Journal of Fermentation Technology* 66, S. 433-439
- Krebs, H.A., Johnson, W.A. (1937): The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissue; *Enzymologia* 4, S. 148-156,
- Kubicek, C.P., Röhr, M. (1986) : Citric Acid Fermentation; *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 3, S. 331-373
- Kuosawa, H. Tanaka, H. (1990): Advances in immobilized cell culture: Development of co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic microorganism, *Process Biochem.*, 25, S. 189-196

- Dr. Lange (1994): Arbeitsvorschriften zu den verschiedenen Phosphat-Küvetten-Tests: LCK348, Ausgabe 95/07; LCK349, Ausgabe 94/01; LCK350, Ausgabe 91/03 der Fa. Dr. Lange, Düsseldorf
- Dr. Lange (1996): Persönliche Mitteilung des Forschungslabors der Fa. Dr. Lange, Düsseldorf
- Langendorf, D. (1999): Zuckerwirtschaft 1999/2000, 46.Jahrgang, Verlag Bartens Berlin 1999
- Larsen, H., Eimhjellen, K.E. (1955): The Mechanism of Itaconic Acid Formation by *Aspergillus terreus*, 1. The Effect of Acidity; *Biochemical Journal* 60, S. 135-139
- Larsen, H., Hovden, H. (1956): Fremgangsmåte for Fremstilling av Itaconsyre ved Gjæring; *Norwegisches Patent Nr. 87616*
- Legiša, M., Jernejc, K., Cimerman, A. (1992): New Aspects of Citric Acid Accumulation in *Aspergillus niger*; *Bioprocess* 1, S. 44-48
- Levy, R.S., Villafranca, J.J. (1977): Structure-Function Relationships in TPN-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. II. Determination of the Paramagnetic Relaxation Rates of Water Protons in Complexes of Enzyme, Mn(II), Substrates, Cofactors, and Inhibitors; *Biochemistry* 16 (15), S. 3301-3309
- Lide, D.R. (Hrsg.) (1996): *CRC-Handbook of Chemical and Physics*, 77. Auflage, 1996-1997, CRC, Boca Raton, S. 8-91
- Lockwood, L.B., Reeves, M.D. (1945): Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus*; *Archives of Biochemistry* 6, S. 455-469
- Lockwood, L.B., Nelson, G.E.N. (1946): Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* in Agitated Cultures; *Archives of Biochemistry* 10, 365-469
- Lockwood, L.B., Ward, G.E. (1945): Fermentation Process for Itaconic Acid; *Industrial and Engineering Chemistry* 37 (4), S. 405-406
- Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Domotenko, L.V., Mamtsis, A.M., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V. (1986): Study of Cryostructurization of Polymer System VII. Structure Formation under Freezing Poly(vinylalkohol) Aqueous Solutions, *Colloid & Polymer Sci.*, 264, S.19-24
- Lozinsky, V.I. Solodova, E.V., Zubov, A.L., Simenel, I.A. (1995): Study of cryostructurization of polymer systems. XI. The Formation of PVA Cryogels by freezing-thawing the Polymer Aqueous Solution containing Additives of Some Polyols. *J.Appl.Polym.Sci.* 58, S.171-177
- Luskin, L.S. (1974): Itaconic Acid; in: Yokum, R.H., Nyquist, E.B. (Hrsg.): *Functional Monomers*; Vol. 2, Marcel Dekker, New York, S. 465-501
- Ma, H., Kubicek, C.P., Röhr, M. (1985) : Metabolic Effects of Manganese Deficiency in *Aspergillus niger*: Evidence for Increased Protein Degradation ; *Archives of Microbiology* 141, S. 266-268
- Manolov, R.G. (1992): Influence of Agitation Rate on Growth and Ribonuclease Production by Free and Immobilized *Aspergillus clavatus* Cells; *Applied Biochemistry and Biotechnology* 33, S. 157-168

- Manolov, R.G., Lozinsky, V.I., Tavobilov, I.M., Vainerman, E.S., Rogozhin, S.V.
 Bezborodov, A.M. (1987): Ribonuclease Biosynthesis by Cells of *Aspergillus clavatus* Immobilized in Poly(vinylalcohol) Cryogel; *Biotechnology and Bioindustry* 2, S. 3-5
- Mattey, M. (1992): The Production of Organic Acids; *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 12, S. 87-132
- Meixner, O., Mischak, H., Kubicek, C.P., Röhr, M. (1985): Effect of Manganese Deficiency on Plasma Membrane Composition and Glucose Uptake in *Aspergillus niger*; *FEMS Microbiology Letters* 26, S. 271-274
- Memmert, K., Uhendorf, R., Wandrey, C. (1987): Einsatz mikroprozessorgeregelter Dosiereinrichtungen in der Biotechnologie; *Chemie-Ingenieur-Technik* 59 (6), S. 501-504
- Merck (1986): Schnelltest Handbuch, E. Merck, Darmstadt, S. 224-239
- Moyer, A.J., Coghill, R.D. (1945): The Laborator-Scale Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus*; *Arch. Biochem.*, 7, 167- 183
- Muscat, A. (1995): Entwicklung und Charakterisierung von polymeren Träger- und Immobilisatmaterialien für eine verbesserte Sauerstoffversorgung, Dissertation TU Braunschweig
- Nelson, G.E.N, Traufler, D.H., Kelley, S.E., Lockwood, L.B. (1952): Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* in 20-Liter Fermentors; *Industrial and Engineering Chemistry* 44 (5), S. 1166-1168
- Nowakowska-Waszczyk, A. (1973): Utilization of Some Tricarboxylic-acid-cycle Intermediates by Mitochondria and Growing Mycelium of *Aspergillus terreus*; *Journal of General Microbiology* 79, S.19-29
- Nubel, R.C., Ratajak, E.D. (1962): Process for Producing Itaconic Acid; *US Patent 3.044.941*, Ohta et al., 1994
- Okabe, M., OHTA, N., Park, Y.S. (1993): Itaconic Acid Production in an Air-Lift Bioreaktor Using a Modified Draft Tube, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol.76, No.2, S. 117-122
- Park, Y.S., Itida, M., Ohta, N., Okabe, M. (1994): Itaconic Acid Production using an Air-Lift Bioreaktor in Repeated-Batch Culture of *Aspergillus terreus*; *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77 (3), S. 329-331
- Petuchow, A.G., Tschernowa, N.G., Tischtschow, W.A., Belenkaja, N.K. (1980): Sposob Proiswodstwa Itakonowoi Kisloty; *UdSSR Patent 732379*
- Petkova, S.G., Anglova Y.M. (1994): Possibilities for Regulation stem Growth of Tobacco Seedlings by Treatment with some Growth Retardants, *Fields Crop. Res.*38, S.175-179
- Petrucchioli, M, Pulci, V., Federici, F. (1999): Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* on raw starchy materials, *Letters in Applied Mikrobiologie* 1999, 28, S. 309-312
- Pfeifer, V.F., Vojnovich, C., Heger, E.N. (1952): Itaconic Acid by Fermentation with *Aspergillus terreus*; *Industrial and Engineering Chemistry* 44 (12), S. 2975-2980
- Pfizer USA (1999): aktuelle Preisinformation, abgerufen über die Homepage der Fa. Pfizer

- Pichler, H., Obenaus, F., Franz, G. (1967); *Erdoel Kohle Erdgas Petrochemie* 20 (3), S. 188, zitiert in Tate (1981)
- Rhone-Poulenc Chimie (1989): Procédé de Production d'Acide itaconique; *Europäisches Patent Nr. 0341112*
- Rhone-Poulenc Chimie (1994): Procédé de Production par Fermentation d'Acide itaconique; *Französisches Patent Nr. 2 702 492*
- Rhone-Poulenc Chimie (1999): aktuelle Preisinformationen, abgerufen über die Homepage der Rhone-Poulenc Chimie
- Rogers, C.E. (1985): Permeation of Gases and Vapours in Polymers; in: Polymer Permeabilität, ed: Comyn, J. *Elsevier Applied Science Publishers*, London 11-73
- Roels, J. A. (1983): *Energetics and Kinetics in Biotechnology*; Elsevier Press, Amsterdam, S. 251
- Prüsse, U., Fox, B., Kichhoff, M., Bruske, F.G., Breford, J., Vorlop, K.-D. (1998) The Cutting Method as a new Immobilization Technique for Spherical Bead Production, *Biotechnol. Tech.* 12, 105-108
- Reimann, C. (1999): Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propanediol mit immobilisierten Zellen, Dissertation FAL-Braunschweig
- Rychtera, M., Wase, D.A.J. (1981): The Growth of *Aspergillus terreus* and Production of Itaconic Acid in Batch and Continuous Cultures. The Influence of pH; *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 31, S. 509-521
- Schlegel, H.G. (1986) : Allgemeine Mikrobiologie; 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 173
- Schmidt, J. (1990): Untersuchung und Modellierung der autotrophen Trinkwasserdenitrifikation mit matriximmobilisierten *Paracoccus denitrificans* DSM 1403, Dissertation TU Braunschweig
- Schüller, H. (1969): Die CAL-Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates in Böden; *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 123, S. 48-63
- Shimi, I.R., Nour El Dein, M.S. (1962) : Biosynthesis of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus*; *Archiv für Mikrobiologie* 44, S. 181-188,
- Scott, C.D., Woodward, C.A., Thompson, J.E. (1989): Solute Diffusion in Biocatalyst Gel beads containing Biocatalysis and other Additives, *Enzyme Microb. Technol.*, 11, S. 258-263
- Shu, P., Johnson, M.J. (1948): The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation; *Journal of Bacteriology* 56, S. 577-585
- Silbiger, E., Freemann, A. (1987): Continuous cell immobilisation in crosslinked polyacrylamidhydrazide beads, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, S. 675-680
- Stryer, L. (1990): *Biochemie*; Spektrum, Heidelberg, S. 985-994
- Tanaka, H., Irie, S., Ochi, H. (1989): A novel Immobilisation Method for Prevention of Cell Leakage from Gel Matrix, *J. Ferment. Bioeng.*, 30, S. 675-680
- Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T. (1993): Industrielle Anwendung von immobilisierten Biokatalysatoren, Marcel Dekker, New York

- Tate, B.E. (1981): Itaconic Acid and Derivatives; in: Grayson, M., Eckroth, E. (Hrsg.): *Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology*, 3. Auflage, John Wiley & Sons, New York, S. 865-873
- Tegge, Günther (1984): Stärke und Stärkederivate, Behr's Verlag, Hamburg
- Thomsen, P. (1998): Untersuchungen von Einflussfaktoren auf die Itaconsäureproduktion mit *Aspergillus terreus* NRRL 1963, Diplomarbeit FAL Braunschweig
- Tzekova, K.V., Vicheva, A.K. (1993): Production of Itaconic Acid in Batch Culture; *Dokladi na Balgarskata Akademija na Naukite* 46 (8), S. 69-72
- Vassilev, N., Kautola, H., Linko, Y.-Y. (1992): Immobilized *Aspergillus terreus* in Itaconic Acid Production from Glucose; *Biotechnology Letters* 14 (3), S. 201-206
- Vorlop, K.-D., Steinert, H.J., Klein, J. (1987): Cell Immobilization within Coated Alginate Beads or Hollow Fibres Formed by Ionotropic Gelation, *Enzym Eng.*, 8, S. 339-342
- Vorlop, K.-D. und Remmers, P. (1990): Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren, DE 4027218
- Vorlop, K.-D. und Remmers, P. (1991): Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren, *Europ. Patent, Nr. 0478097*
- Vorlop, K.-D. und Breford, J. (1994): Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Teilchen aus einem flüssigen Medium. *Deutsches Patent P 44245998*
- Watase, M. (1983): Nippon Kagaku Kaisi, 9, 21254
- Wainwright, M (1992): Biotechnologie mit Pilzen, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1995
- Wuhan Chemicals Import & Export, Cultor Science (1999): aktuelle Preisinformation, abgerufen über die Homepage der Wuhan Chemicals Import & Export
- Wijffels, R.H., de Gooijer, C.D., Schepers, A.W., Tramper, J. (1996): Immobilized-cell growth: diffusion limitation in expanding micro-colonies, in: *Immobilized Cells: Basics an Application*, eds. Wijffels, R.H., Buitelaar et al, Elsevier Science, S. 249-256
- Willke, Th. (1997): Reaktionskinetische und wachstumsphysiologische Untersuchung an freien und immobilisierten Nitrifizierern, Dissertation TU Braunschweig
- Winskill, N. (1983): Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Relation to Itaconic Acid Biosynthesis by *Aspergillus terreus*; *Journal of General Microbiology* 129, S. 2877-2883
- Wittlich, P. (1996) : Untersuchungen zur Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Zellen von *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum*; Diplomarbeit TU Braunschweig
- Wittlich, P. Jahnz, U. (1998): Entwicklung einer Apparatur für die Herstellung von LentiKats®, FAL Braunschweig
- Yahiro, K., Takahama, T., Jai, S., Park, Y., Okabe, M. (1997): Comparison of Air-lift and Stirred Tank Reactors for Itaconic Acid Production by *Aspergillus terreus* ; *Biotechnology Letters* 19 (7), S. 619-621
- Yahiro, K., Takahama, T., Park, Y., Okabe, M. (1995): Breeding of *Aspergillus terreus* Mutant TN-484 for Itaconic Acid Production with High Yield; *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79 (5), S. 506-508
- Zollner, H. (1993): *Handbook of Enzyme Inhibitors*; 2. Auflage, VCH, Weinheim, S. 290-291 und S. 887